

UCH-FC  
Doc-BMCN  
L 864  
C 1



# Respuesta a feromonas en el epitelio olfatorio principal de ratón: papel de las neuronas sensoriales olfativas que expresan el canal TRPM5

Tesis  
Entregada A La  
Universidad De Chile  
en Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y  
Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

Fabián Andrés López Santillo

diciembre, 2013

Directores de Tesis:

Dr. Juan Bacigalupo  
Dr. Diego Restrepo

A mis Padres por su apoyo incondicional.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Fabián Andrés López Santillo

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 6 de noviembre del 2013.

Director de Tesis:  
Dr. Juan Bacigalupo

Director de Tesis  
Dr. Diego Restrepo

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga

.....

Dr. Rodolfo Madrid

.....

Dr. Christian González-Billault

.....

Dr. Oliver Schmachtenberg

.....



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanos y familiares, por entregarme las herramientas necesarias para mí aprendizaje, por su constante apoyo a pesar de estar en un área profesional distinta a la de ellos, y sobre todo por creer en mí.

Al Dr. Juan Bacigalupo, por entregarme las herramientas y el espacio en su laboratorio para poder llevar a cabo esta tesis. Por aceptar ser mi tutor y acompañarme en el largo camino de la realización de esta. Por su preocupación y exigencia para que esta tesis fuera de un alto nivel. Por las constantes conversaciones y discusión científicas que me permitieron desarrollar de la mejor manera posible este trabajo de investigación.

Al Dr. Diego Restrepo, por aceptar ser mi tutor y recibirme en su laboratorio en Estados Unidos, donde estuve por más de 7 meses. Por creer en mí y por todo el apoyo incondicional que me entrego y que me sigue entregando. Por todas las discusiones y conversaciones científicas que me hicieron madurar como científico.

Al Dr. Ricardo Delgado, por toda la ayuda prestada a lo largo de esta tesis, por estar siempre presente cuando lo necesitaba, por motivarme a llevar a cabo este trabajo, y por provocar en mí un gusto incondicional hacia la electrofisiología y neurociencia.

Al comité de mi tesis, por todos los aportes realizados a lo largo de esta tesis: Dr. Rodolfo Madrid, Dr. Julio Alcayaga, Dr. Christian González-Billault y Dr. Oliver Schmachtenberg.

A mis compañeros, y doctores que pertenecen o pertenecieron al laboratorio de Fisiología Celular, por su constante aliento, y aportes a este proyecto: Jorge V., Germán F., Marcelo S., Dr. Maurizio P., Camilo G., Ignacio D., Ulises P., Daniel K., Carolina G., Graciela D., Dra. Guadalupe A., Dra. Viviana V., Kris B., Pablo V., Gabriela P., Belén A., Yorka M., Estefanía L., Daniel E., Casila M., Danny A., Jorge A., Jeannette B., Dra. Cecilia V., Dr. Julio A., Dr. Osvaldo A., Dr. Carlos M, Dra. Magdalena Sanhueza....a ustedes muchas gracias.

A mis compañeros, y doctores que pertenecen al laboratorio del Dr. Diego Restrepo, por su gran ayuda durante los 7 meses de mi pasantía en Colorado: Barish O., Roberto L., Dr. Shane R., Dr. Nicolas B., Nicole A., Brooke B., Elizabeth G., Erin C., Lois L., Michael F., Dr. Anan L., Dr. Ernesto S., Dr. Thomas F., Dra. Jennifer H., Dra. Linda B., Dra. Sue K., Dr. Marcos T....a ustedes muchas gracias.

A mis compañeros de Doctorado, con quienes inicie esta linda aventura: Gabriela T., Gabriela Z., Erick C., Pablo M., Christian G., Luis M., Cesar R., Adriana P., Lorena P., Juan Pablo C....a ustedes muchas gracias.

A mis compañeros de Bioquímica, por su apoyo y por todos los momentos de discusión que me hicieron ver que la neurociencia es mi área de interés, Roberto M., Francisco B., Esteban M., Alejandro B., Alejandro M., Felipe M., Francisca G., Estefanía C...a ustedes muchas gracias.

Quisiera agradecer también a mi polola María Ignacia Pérez, por todo su apoyo incondicional a pesar de que nos enfocamos en rubros completamente diferentes, por su amor y por creer en mí.

También me gustaría agradecer a mis amigos del colegio y de la vida, que han estado siempre a mi lado y que de una manera u otra también aportaron su granito de arena para que yo pudiese concluir esta etapa de mi vida: Pablo G., Sebastián B., Gabriel S., Agustín T., Andrés I., Javier H., Sebastián F., Pedro E....a ustedes muchas gracias.

Agradecer también al financiamiento que hizo posible la realización de esta tesis: Beca Conicyt para la realización de Doctorado en Chile 2009, Beca Conicyt de Apoyo a la realización de tesis doctoral. Beca Mecesup de Pasantía en el extranjero. Extensión Beca Conicyt de Doctorado en Chile. Fondos de investigación, MIDEPLAN ICM-P05-001 (JB), FONDECYT 1100682 (JB), DC04657 (DR), DC006070 (DR) y TW007920 (JB y DR).

## INDICE DE MATERIAS

LISTAS DE TABLAS	x
LISTAS DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xviii
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
A. Morfología del epitelio olfatorio principal de mamíferos.	2
B. Receptores olfativos.	5
C. Mecanismo de quimiotransducción olfativa.	7
D. El código del odorante.	10
E. Procesamiento a nivel central.	10
F. Feromonas.	13
G. Anatomía del órgano vomeronasal.	14
H. Receptores de feromonas del epitelio vomeronasal.	15
I. Transducción feromonal en el OVN.	16
J. Transducción feromonal en el EOP.	21
K. Superfamilia de canales iónicos TRP y su participación en los sistemas sensoriales.	22
L. El canal TRPM5 en el EOP.	25

<b>HIPOTESIS DE TRABAJO</b>	29
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	29
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	29
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	30
A. Animales.	30
B. Soluciones.	31
C. Disociación de las neuronas quimiosensoriales.	31
D. Lista de reactivos	32
E. Registros electrofisiológicos.	34
F. Sistema de estimulación	36
G. Determinación de la concentración de odorantes a nivel de la célula.	37
H. Inmunocitoquímica	38
I. Imágenes de Calcio	42
J. Análisis de las mediciones de fluorescencia de $Ca^{2+}$ .	43
K. Monitoreo del efecto <i>Lee Boot</i> del ciclo estral en ratones.	43
L. Estadística.	44
<b>RESULTADOS</b>	45
A. Los cilios de las NQSs TRPM5 <sup>+</sup> expresan el canal CNGA2, pero no el canal de Cl <sup>-</sup> activado por $Ca^{2+}$ ANO2.	45
B. Las NQSs TRPM5 <sup>+</sup> responden a feromonas, orina y péptidos del MHC, pero no a odorantes.	47

C.	Algunas NQSS TRPM5 <sup>+</sup> reconocen más de una feromona.	50
D.	Los experimentos farmacológicos indican que el canal TRPM5 media la respuesta a feromonas en las NQSS TRPM5 <sup>+</sup> .	52
E.	La activación de TRPM5 está acoplada a la entrada de Ca <sup>2+</sup> a través del canal CNG.	54
F.	El Ca <sup>2+</sup> extracelular que ingresa por el canal CNGA2 es responsable de la activación del canal TRPM5.	59
G.	La corriente a través de CNGA2 aumenta en ausencia de Ca <sup>2+</sup> extracelular.	61
H.	NQSS del ratón <i>knockout</i> para TRPM5 no responden a feromonas.	63
I.	El ratón <i>knockout</i> de TRPM5 expresa CNGA2 y no el canal de cloruro ANO2.	65
J.	Los ratones <i>knockout</i> del canal TRPM5 no presentan el efecto <i>Lee-Boot</i> .	65
K.	Las NQSS TRPM5 <sup>+</sup> del órgano vomeronasal responden a 2-heptanona y a DMP.	67
L.	Separación de NQSS TRPM5 <sup>+</sup> y TRPM5 <sup>-</sup> con la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Datos preliminares.	70
<b>DISCUSION</b>		72
A.	Transducción feromonal en NQSS TRPM5 <sup>+</sup>	72
B.	Confirmación de la presencia de un canal TRPM5 funcional en los cilios de las NQSS que lo expresan.	77
C.	Análisis de las concentraciones de feromonas a las que responden las NQSS del EOP y del OVN.	79
D.	¿Cuál es el receptor expresado en las NQSS TRPM5 <sup>+</sup> ?	80
E.	La estimulación con feromonas induce incrementos de Ca <sup>2+</sup> en los cilios que toman lugar en microdominios.	81

F.	Comparación de la latencia, la amplitud máxima y la cinética de relajación entre las corrientes y los incrementos de $\text{Ca}^{2+}$ .	82
G.	Importancia fisiológica de las NQSs TRPM5 <sup>+</sup> en el EOP.	84
H.	Posible respuesta a feromonas en humanos y primates superiores.	86
<b>BIBLIOGRAFIA</b>		<b>88</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Soluciones usadas en los diferentes experimentos	31
<b>Tabla 2.</b>	Reactivos	34

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Representación del sistema olfativo de la nariz del ratón.	3
<b>Figura 2.</b>	Tipos celulares que constituyen el epitelio olfatorio principal.	4
<b>Figura 3.</b>	Árbol filogenético de los receptores de odorantes.	6
<b>Figura 4.</b>	Diagrama de la vía de transducción olfatoria canónica en los cilios de las NQSs del epitelio olfatorio principal de ratón.	9
<b>Figura 5.</b>	Modelo que representa la diversidad de receptores olfatorios.	11
<b>Figura 6.</b>	Representación del relevo de la señal eléctrica en el bulbo olfatorio principal.	12
<b>Figura 7.</b>	Filogenia de receptores funcionales del OVN de ratón.	17
<b>Figura 8.</b>	Vías de quimiotransducción en el epitelio vomeronasal.	20
<b>Figura 9.</b>	Árbol filogenético de la superfamilia de canal TRP.	24
<b>Figura 10.</b>	Histograma acumulativo de emisión de la intensidad de fluorescencia GFP.	33
<b>Figura 11.</b>	Medición de la fracción de $K^+$ en la pipeta que llega a la célula de acuerdo al procedimiento de Firestein.	39
<b>Figura 12.</b>	Imagen de un corte coronal del epitelio olfatorio que muestra dorsalmente el epitelio olfatorio principal (EOP) y ventralmente el epitelio respiratorio (ER).	41
<b>Figura 13.</b>	Las NQSs que expresan GFP también expresan el canal catiónico	

	no selectivo CNGA2 pero no expresan el canal de cloruro ANO2.	46
<b>Figura 14.</b>	NQs TRPM5 <sup>+</sup> responden a péptidos del MHC, feromonas y orina recolectada de macho y hembra C57BL/6, pero no a odorantes ambientales.	48
<b>Figura 15.</b>	Resultados de experimentos de <i>loose-patch</i> donde NQs TRPM5 <sup>+</sup> fueron estimuladas con 12,5 nM de 2-heptanona, DMP y dos péptidos del MHC.	51
<b>Figura 16.</b>	El bloqueador del canal TRPM5 (TPPO) inhibe reversiblemente las respuestas a feromonas en NQs TRPM5 <sup>+</sup> pero en las NQs TRPM5 <sup>-</sup> .	53
<b>Figura 17.</b>	Bloqueo de ANO2 con ácido niflúmico suprime la respuesta a odorantes y feromonas en NQs TRPM5 <sup>-</sup> , pero no la respuesta a feromonas en NQs TRPM5 <sup>+</sup> .	55
<b>Figura 18.</b>	La inhibición del CNGA2 con L- <i>cis</i> -diltiazem es consistente con la apertura del CNGA2 después de la estimulación con feromonas en las NQs GFP <sup>+</sup> .	57
<b>Figura 19.</b>	El canal TRPM5 del cilio de las NQs TRPM5 <sup>+</sup> es posiblemente activado por Ca <sup>2+</sup> extracelular.	60
<b>Figura 20.</b>	CNGA2 participa en la respuesta a feromonas en NQs TRPM5 <sup>+</sup> .	62
<b>Figura 21.</b>	TRPM5 <i>knockout</i> sustancialmente disminuye la respuesta de las NQs que expresan GFP en ratones TRPM5-KO-GFP.	64
<b>Figura 22.</b>	NQs aisladas del ratón TRPM5-KO-GFP <sup>+</sup> expresan CNGA2 pero no ANO2.	66
<b>Figura 23.</b>	Los ratones knockout del canal TRPM5 no presentan el efecto Lee-Boot.	68
<b>Figura 24.</b>	NQs TRPM5 <sup>+</sup> del órgano vomeronasal responden a 2-heptanona y a DMP.	69
<b>Figura 25.</b>	Datos preliminares de FACS.	71
<b>Figura 26.</b>	Diagrama que muestra la vía de transducción a feromonas en los cilios de las NQs TRPM5 positivas.	76

<b>Figura 27.</b>	Registros de <i>patch-clamp inside-out</i> obtenidos desde el cilio de las NQSs TRPM5 <sup>+</sup> .	78
<b>Figura 28.</b>	Inmunohistoquímica del órgano vomeronasal.	85

## ABREVIATURAS

ACIII: Adenil Ciclasa tipo III

CNG: Canal gatillado por nucleótido cíclico

DMP: 2.5-Dimetilpirazina

DMSO: Dimetil sulfoxido

DRG: Neuronas del ganglio de la raíz dorsal

EGTA: Etilen glicol del ácido tetraacético

EOG: Electroolfatograma

EOP: Epitelio Olfatorio Principal

GFP: Proteína fluorescente verde

HEPES: *N*-2-hidroxietilpiperazina-*N*-2-etanosulfónico ácido

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

IP<sub>3</sub>: Inositol 1,4,5-trifosfato

LCD: *L-cis*-diltiazem

NQS: Neurona quimiosensorial

OVN: Órgano Vomeronasal

PLC: Fosfolipasa C

TAAR: Receptores de traza de aminas

TPPO: Oxido de Trifenilfosfina

V1R: Receptor vomeronasal 1

V2R: Receptor vomeronasal 2

## RESUMEN

Las feromonas no solo son detectadas por el órgano vomeronasal (OVN), sino también por el epitelio olfatorio principal (EOP). La transducción de odorantes comienza con la unión de una molécula de odorante a un receptor olfatorio (RO) que se encuentra en la membrana ciliar de las neuronas quimiosensoriales (NQSs) del EOP. Esta unión activa primero al RO, luego a la proteína  $G\alpha$  específica de las NQSs ( $G_{olf}$ ), y cada  $G_{olf}$  activa a su vez una enzima adenilato ciclasa tipo III (ACIII). La ACIII cataliza la producción de AMPc, que abre el canal gatillado por nucleótidos cíclicos (CNG), por el cual entra  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ , despolarizando la membrana. El  $Ca^{2+}$  activa su vez un canal de  $Cl^-$ , que despolariza aún más a la membrana.

Estudios previos (Lin y cols., 2007) sugieren que una pequeña población de neuronas que expresan el canal catiónico monovalente no selectivo TRPM5, que es directamente activado por  $Ca^{2+}$  intracelular en un rango de concentraciones de 0,3 a 1  $\mu M$ , está implicado en la transducción de feromonas mediante un mecanismo desconocido.

Utilizando anticuerpos específicos, el presente trabajo muestra que la subpoblación de NQSs TRPM5<sup>+</sup> expresan el CNG pero, a diferencia de las NQSs TRPM5<sup>-</sup>, no expresan el canal de  $Cl^-$  activado por  $Ca^{2+}$ , ANO2. Registros de NQSs aisladas muestran también que las NQSs TRPM5<sup>+</sup> responden selectivamente a concentraciones bajas (12,5 nM) de un conjunto de feromonas, péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y

orina tanto de macho como de hembra, pero no a odorantes. Las NQs TRPM5<sup>-</sup> responden a todas estas moléculas pero a concentraciones más altas (12,5  $\mu$ M). La exposición de las NQs a TPPO, un bloqueador específico del TRPM5, suprime la respuesta en las NQs TRPM5<sup>+</sup> pero no en las NQs TRPM5<sup>-</sup>. Ácido niflúmico, que es un inhibidor selectivo del canal ANO2, no suprime la respuesta en las NQs TRPM5<sup>+</sup>, pero sí en las NQs TRPM5<sup>-</sup> a concentraciones altas. Además, el *knockout* de TRPM5 no presenta respuesta a feromonas en las NQs TRPM5<sup>+</sup>, pero sí en las TRPM5<sup>-</sup>, las que reconocerían estas moléculas como un odorante. En ausencia de Ca<sup>2+</sup> externo las corrientes inducidas por feromonas en NQs TRPM5<sup>+</sup> son de mayor amplitud, y no son bloqueadas por TPPO, pero sí por el bloqueador del canal CNG (*L-cis*-diltiazem). Para corroborar la participación del canal CNG en la activación del canal TRPM5, realicé un estudio de imágenes de Ca<sup>2+</sup>. Observé que en las NQs TRPM5<sup>+</sup> la estimulación con feromonas, pero no con odorantes, produce un incremento en el Ca<sup>2+</sup> intraciliar, proveniente del medio extracelular. En contraste, las NQs TRPM5<sup>-</sup> mostraron un incremento en el Ca<sup>2+</sup> intraciliar al ser estimuladas con odorantes y con feromonas. Adicionalmente, registros de corrientes inducidas por Ca<sup>2+</sup> en parches escindidos en modalidad *inside-out* de cilio de NQs TRPM5<sup>+</sup>, realizados por el Dr. Ricardo Delgado, verifican que las NQs TRPM5<sup>+</sup> expresan un canal catiónico no específico (TRPM5) funcional en los cilios.

El canal TRPM5 no solo está localizado en NQs del EOP, también es expresado en células con microvellosidades del EOP y en NQs del OVN y del sistema gustativo (Lin y cols, 2007, Zhang y cols., 2003, Damak y cols., 2006). En este trabajo se muestra que solo el 8% de las NQs TRPM5<sup>+</sup> del OVN responden a DMP en registros de *loose-patch*.

Para verificar conductualmente si los canales TRPM5 del EOP participan en la detección de feromonas, realicé un estudio conductual en el cual se observa que las hembras de los ratones *knockout* de TRPM5 no presentan el efecto *Lee Boot* (Ma y cols., 1998), que corresponde a la prolongación del ciclo estral mediada por feromonas ante el encierro con otras hembras. Esta alteración apoya fuertemente la idea de que las NQs que expresan TRPM5 participan de manera importante en la detección de feromonas.

El aporte de esta tesis es particularmente relevante para futuros estudios en humanos y en primates superiores, donde se sospecha que podrían existir respuestas a feromonas, a pesar de que no cuentan con un sistema vomeronasal funcional (Trotier, 2011).

## ABSTRACT

Pheromones are detected not only by the vomeronasal organ (VNO) but also by the main olfactory epithelium (MOE). Odorant transduction begins with the binding of one molecule to the olfactory receptor (OR) which is located in the ciliary membrane in olfactory sensory neurons (OSNs). This binding activates the OR that then excites the protein-specific  $G_{\alpha}$  (Golf). Then each  $G_{olf}$  activates one adenylyl cyclase type III (ACIII) generating cAMP, which directly gates cyclic-nucleotide-gated channels (CNG), allowing the influx of  $Na^{+}$  and  $Ca^{2+}$ , that in turn opens  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^{-}$  channels, principally ANO2. Both channels generate a depolarizing response.

Previous evidence (Lin et. al., 2007) suggested that a small subpopulation of neurons expressing the  $Ca^{2+}$ -activated monovalent cation-selective channel TRPM5, which is directly activated by intracellular  $Ca^{2+}$  in a concentration range of 0.3 to 1  $\mu M$ , were implicated in pheromone transduction by an unknown mechanism.

Using specific antibodies the present work shows that the subpopulation of TRPM5<sup>+</sup> OSNs express the CNG channel but, unlike TRPM5<sup>-</sup> OSNs, do not express the  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^{-}$  channels ANO2. Records in isolated OSNs show that TRPM5<sup>+</sup> OSNs respond selectively at low concentration (12.5 nM) to a set of pheromones, MHC peptides and urine of male and female, but not to odorants. The TRPM5<sup>-</sup> OSNs respond to all of these molecules, but at higher concentration (12.5  $\mu M$ ). TPPO, a specific blocker of TPRM5,

suppresses the response in the TRPM5<sup>+</sup> OSN but not in TRPM5<sup>-</sup> OSNs. Nevertheless niflumic acid, a selective inhibitor of the ANO2 channel does not suppress the response in TRPM5<sup>+</sup> OSNs, but does suppress responses in TRPM5<sup>-</sup> OSNs.. Additionally, the TRPM5 knockout OSNs do not respond to pheromones in TRPM5<sup>+</sup> OSNs, but TRPM5<sup>-</sup> OSNs respond. In absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> the current elicited by pheromones in TRPM5<sup>+</sup> OSNs have higher amplitude, and they are not blocked with TPPO, but with the blocker of the CNG channel (*L-cis*-diltiazem). To corroborate the involvement of CNG channel in the activation of TRPM5, I did a study of Ca<sup>2+</sup> imaging. Stimulation with pheromones, but not odorant, produced an increase of intraciliary Ca<sup>2+</sup> in TRPM5<sup>+</sup> OSNs, from the extracellular medium. In contrast, the TRPM5<sup>-</sup> OSNs show an increase of intraciliary Ca<sup>2+</sup> when stimulated with odorants and pheromones. Finally, records of induced currents with Ca<sup>2+</sup> in excised patch of cilium of TRPM5<sup>+</sup> OSNs in inside-out modality, made by Dr. Ricardo Delgado, verified that TRPM5<sup>+</sup> OSNs express a functionally non specific cationic channel (TRPM5) in the cilia.

TRPM5 channel is not only located in OSNs at the MOE, but is also expressed in taste cells and in a small number of microvillar cells of the VNO (VSNs) (Lin et al., 2007, Zhang et al., 2003, Damak et al., 2006). This study shows that only 8% of TRPM5<sup>+</sup> VSNs respond to DMP in loose-patch records.

To verify behaviorally if the TRPM5 channels in the MOE are involved in pheromone detection, I did a study that shows that TRPM5 knockout female mice do not exhibit the *Lee Boot* effect (Ma et al., 1998), which is the prolongation of the estrous cycle mediated by pheromones when multiple female mice are housed per cage. This effect

strongly supports the idea that OSNs expressing TRPM5 are involved in pheromone detection.

The contribution of this thesis is particularly relevant for future studies in humans and higher primates where, although they do not have a functional vomeronasal system (Trotier, 2011), it is suspected that there may be responses to pheromones.

## INTRODUCCION

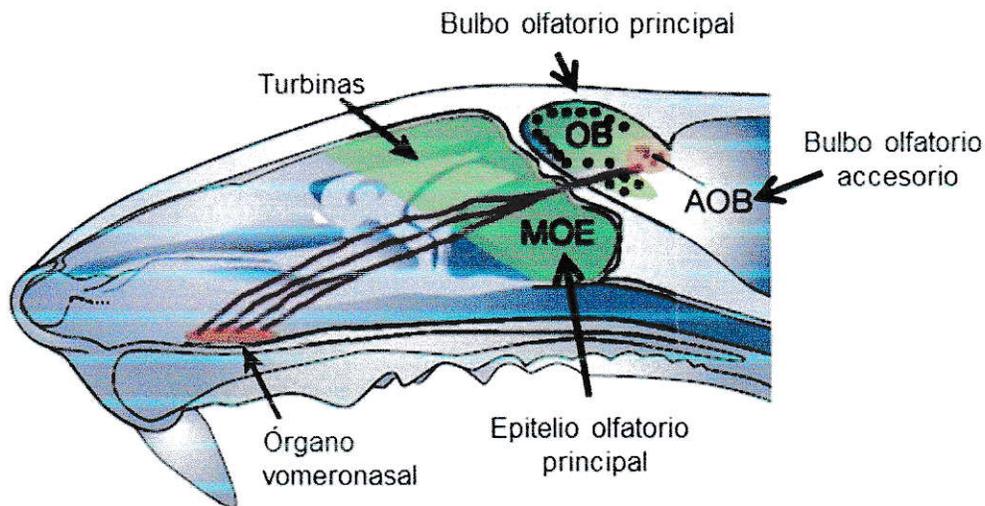
Evolutivamente, los receptores de estímulos químicos son los más primitivos. Desde la forma de vida unicelular más simple hasta las criaturas multicelulares más complejas poseen la capacidad de detectar determinadas moléculas del ambiente. Además, los seres vivos emiten sustancias químicas como una señal de comunicación. La mayoría de los vertebrados cuentan con sistemas olfativos que expresan diversos receptores que le permiten localizar comida y pareja y detectar el peligro. Los quimiorreceptores expresados en órganos olfativos son receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y se pueden clasificar en dos categorías principales: los receptores de odorantes (RO) y los receptores de feromonas, que principalmente detectan compuestos químicos volátiles que son reconocidos por el sistema olfativo como un olor (odorantes generales) y las feromonas que son compuestos químicos secretados o excretados por un individuo que afectan el comportamiento de otro, (Ma, 2012). A excepción de los primates superiores (Hansen y Finger, 2000; Baum, 2012; Wysocki y Preti, 2004), la mayoría de los mamíferos poseen dos sistemas quimiosensoriales separados en su cavidad nasal, el epitelio olfatorio principal (EOP) y el órgano vomeronasal (OVN) (*Figura 1*). Es ampliamente aceptada la idea de que las neuronas quimiosensoriales (NQSs) del epitelio olfatorio principal (EOP) son las responsables de la detección de moléculas de odorantes presentes en el entorno, y que las NQSs del OVN, una estructura tubular localizada en el piso de la cavidad nasal y que forma parte del sistema olfatorio accesorio, son las responsables de la detección de las feromonas (Dulac y Torello, 2003; Halpern y Martínez-Marcos, 2003). Estudios recientes

indican que la separación funcional entre estos dos sistemas no es muy clara (Baum, 2012; Wang y cols., 2007; Wilson y Rennaker, 2010; Zufall y Leinders-Zufall, 2007).

#### **A. Morfología del epitelio olfatorio principal de mamíferos.**

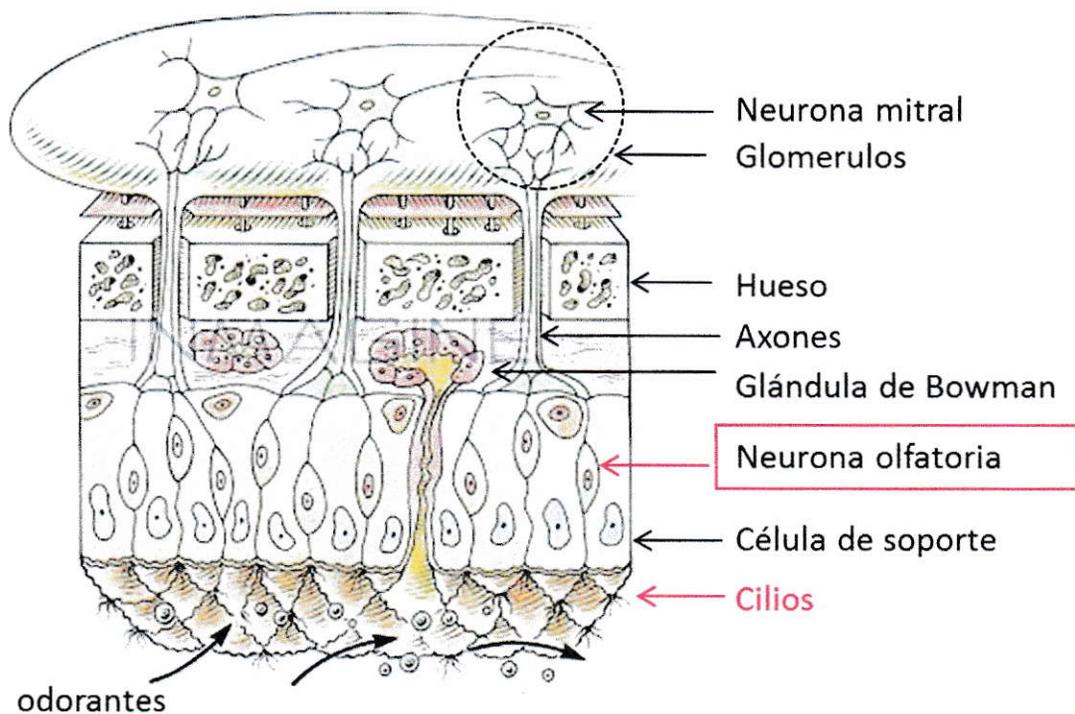
El epitelio olfatorio principal, está localizado en el área posterior/dorsal de la cavidad nasal (*Figura 1*), y está constituido por cuatro tipos de células distinguibles morfológicamente: neuronas quimiosensoriales (NQSs, maduras e inmaduras), células sustentaculares (o de soporte), células basales, células con microvellosidades y células de la capsula de Bowman (*Figura 2*).

Las NQSs del EOP tienen una estructura filogenéticamente muy conservada entre los vertebrados: son neuronas bipolares de un tamaño entre 50-100  $\mu\text{m}$ , provistas de una única dendrita desde cuyo extremo apical, el botón dendrítico, emergen entre 10 a 30 cilios olfatorios (Menco, 1997). Los cilios están en contacto directo con los odorantes provenientes del medio ambiente y en ellos se inicia el proceso de quimiotransducción (Graziadei y Graziadei, 1979). Parte importante del proceso de codificación de la información olfativa se realiza a nivel del epitelio olfatorio principal, mientras que en el bulbo olfatorio principal (BOP) se produce el contacto sináptico entre los axones de las neuronas olfatorias primarias con las células mitrales y las células en penacho (Kandel y cols., 2000; Finger y cols., 2000; Gire y cols., 2013), en estructuras esféricas denominadas glomérulos. Estas células transmiten las señales eléctricas hacia la corteza olfatoria.



**Figura 1. Representación del sistema olfativo de la nariz del ratón.**

Se muestra la separación del órgano vomeronasal del epitelio olfatorio principal. Los axones de las neuronas quimiosensoriales del órgano vomeronasal proyectan al bulbo olfatorio accesorio, mientras que las neuronas quimiosensoriales del epitelio olfatorio principal proyectan al bulbo olfatorio principal (Modificado de Firestein, 2001).



**Figura 2. Tipos celulares que constituyen el epitelio olfatorio principal.**

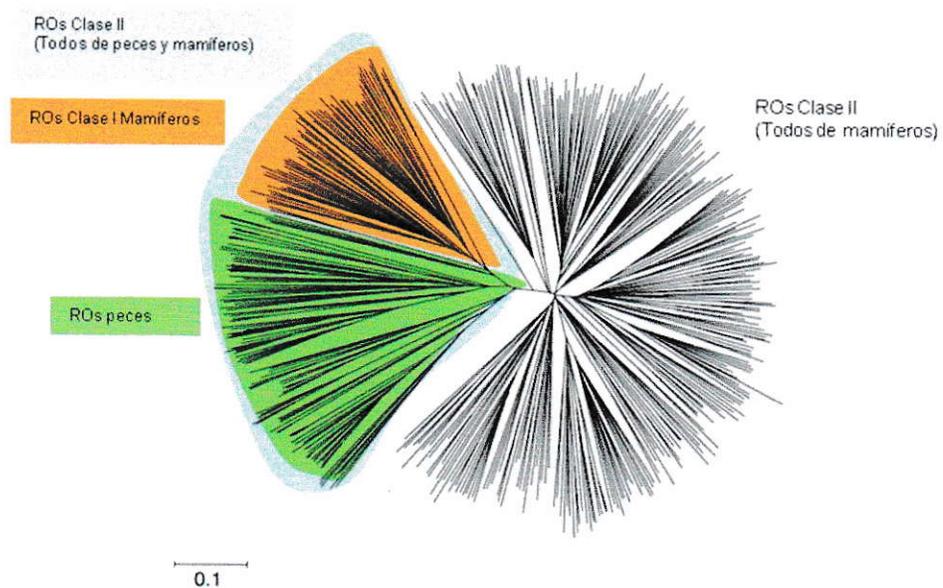
Corte transversal del epitelio olfatorio principal donde se muestran los diferentes tipos de células que lo constituyen: Neuronas quimiosensoriales (NQSs, maduras e inmaduras), células sustentaculares (o de soporte, CS), células de la glándula de Bowman (GB).

Las células sustentaculares, junto con la glándula de Bowman, secretan componentes del moco que ayudan a capturar y remover los odorantes y a mantener hidratado el epitelio (Katz y Merzel, 1977). Además de las NQs y de las células sustentaculares encontramos células troncales, llamadas células basales, que se dividen en dos clases, horizontales y globosas, ambas capaces de dividirse y proliferar. Estas células reemplazan a las células sustentaculares y a las NQs que son dañadas debido a la exposición al ambiente, lo que ocurre a lo largo de toda la vida (Carr, V.M. y Farbman, A.I., 1993). Finalmente encontramos una pequeña población de células con microvellosidades y carentes de axón, de las cuales solo se sabe que pueden sintetizar y liberar localmente acetilcolina, ejerciendo presumiblemente una actividad moduladora sobre las células de soporte y las NQs vecinas (Ogura y cols., 2011).

## **B. Receptores olfativos.**

La percepción del olor comienza cuando una molécula que se encuentra en el aire es atrapada dentro del moco y difunde por éste para finalmente unirse a una de las múltiples proteínas receptoras de odorantes (*Figura 3*; Mombaerts, 1999; Buck, 2000; Firestein, 2001).

Hoy día, debido a que los genomas de humano y ratón se encuentran secuenciados, tenemos una idea del número total de proteínas receptoras olfativas en estas dos especies. En el ratón hay 1.391 genes de receptores olfativos (Zhang y Firestein, 2002), de los cuales 354 son pseudogenes, dejando a 1.037 genes funcionales. En el humano hay 802 genes (Glusman y cols., 2001, Zozulya y cols., 2001), de los cuales 414 son pseudogenes, y 388 corresponden a proteínas funcionales.



**Figura 3. Árbol filogenético de los receptores de odorantes.**

Clasificación de los receptores de odorantes (RO) de peces y mamíferos. Los genes de los ROs pueden ser separados dentro de dos clases basados en sus secuencias. Los mamíferos tienen ROs de ambas clases, I y II, mientras que todos los ROs de peces pertenecen a la clase I. Los ROs de insectos son muy diferentes unos de otros y también difieren de los ROs de peces y mamíferos. Los ROs de clase I están sombreados con azul, los ROs de clase I de mamíferos en naranja, y los ROs de peces en verde (Modificado de Zhang y Firestein, 2009).

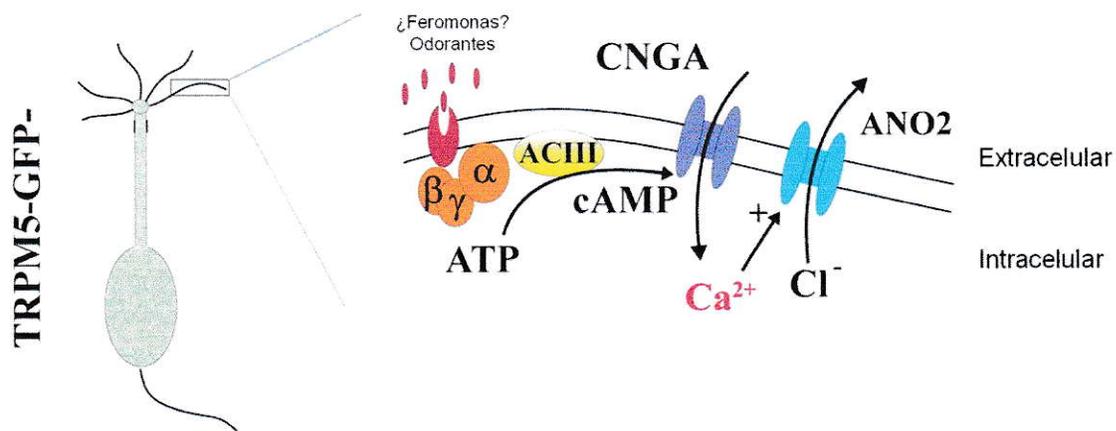
La mayoría de las NQSs en el ratón expresan solo uno de entre los 1.391 genes de receptores olfativos (Chess y cols., 1994, Mori y Sakano, 2011). Sin embargo, un pequeño número de NQSs expresan múltiples receptores (Ressler y cols., 1994, Vassar y cols., 1994, Rawson y cols., 2000, Mombaerts, 2004). Adicionalmente, existe una segunda familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) quimiosensoriales en el epitelio olfatorio principal, llamados receptores de traza de aminos (TAARs) (Liberles y Buck, 2006). Se han identificado 15 TAARs en ratón y 6 en humano (Liberles y Buck, 2006). Algunos de los TAARs de ratón reconocen aminos volátiles, de la cuales algunas son constituyentes naturales de la orina, como la 2-feniletilamina (vinculada al estrés), la trimetilamina y la isoamilamina, que podrían ser feromonas (Liberles y Buck, 2006).

### C. Mecanismo de quimiotransducción olfativa.

El cambio de potencial de membrana que evocan los odorantes comienza con la unión de una molécula de odorante a un RO que se encuentra en la membrana ciliar de las NQSs (Dulac y Torello, 2003; Halpern y Martínez-Marcos, 2003). Esta unión activa primero al RO, luego a la proteína G específica de las NQSs ( $G_{olf}$ , Jones y Reed, 1989), y cada  $G_{olf}$  activa a su vez a una enzima adenilato ciclasa tipo III (ACIII) (Bakalyar y Reed, 1990), que cataliza la producción de AMPc, el cual abre el canal gatillado por nucleótido cíclico (CNG), por el cual entra  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ , despolarizando la membrana (Baker y cols., 1999; Nakamura y Gold, 1987; Brunet y cols., 1996). El  $Ca^{2+}$  activa a su vez un canal de  $Cl^-$ , que despolariza aún más a la membrana (Kleene y Gesteland, 1991; Lowe y Gold, 1993) (*Figura 4*). El gradiente electroquímico para el ion  $Cl^-$  en el cilio favorece al flujo de salida de este anión a través del canal de cloruro activado por  $Ca^{2+}$ , lo que potencia

significativamente el efecto despolarizador del canal CNG (Lowe y Gold, 1993). Se ha sugerido que este canal de  $\text{Cl}^-$  es el canal ANO2, perteneciente a la familia de canales TMEM16 (Rasche y cols., 2010; Stephan y cols., 2009; Stohr y cols., 2009). Sin embargo, recientemente se han detectado en los cilios olfatorios de las NQs de rata dos canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (ClCa4l y ClCa2), miembros de la familia ClCa (Gonzalez-Silva y cols., 2013). En las NQs de ratón el canal CNG produce una pequeña contribución en la corriente de quimiotransducción comparada con el canal de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  (15% en ratón (Lowe y Gold, 1993a), mientras que en la salamandra tigre la contribución de CNG es de un 60% (*Ambystoma tigrinum*; Kurahashi y Yau, 1993).

La inhibición farmacológica de elementos de la vía del AMPc, incluyendo el canal CNG, la proteína  $G_{\text{olf}}$  y la ACIII, resulta en una alteración severa de la respuesta a odorantes en la mayoría de las NQs, demostrando un rol dominante de la vía del AMPc en las NQs del EOP (Lin y cols., 2004; Lin y cols., 2007, Zufall y Munger, 2001). Adicionalmente, la vía del AMPc está sujeta a una regulación mediante retroalimentación negativa, la cual ocurre a través del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, que reduce la afinidad de los canales CNG por AMPc (Chen y Yau, 1994), disminuye los niveles de AMPc intraciliar a través de la activación de la fosfodiesterasa PDE1C2 (Borisov y cols., 1992; Yan y cols., 1995) y reduce la síntesis de AMPc mediante fosforilación del residuo ser-1076 de ACIII por CaMKII (Wayman y cols., 1995; Zufall y Leinders-Zufall, 2000). Finalmente también se ha descrito la existencia de una respuesta inhibitoria en las NQs de mamíferos (Delay y Restrepo 2004; Duchamp-Viret y cols., 1999; Sanhueza y cols., 2000), la cual ocurre a través de la activación de una conductancia de  $\text{K}^+$  dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  intraciliar mediada por la vía de transducción de AMPc (Madrid y cols., 2005).



**Figura 4. Diagrama de la vía de transducción olfatoria canónica en los cilios de las NQs del epitelio olfatorio principal de ratón.**

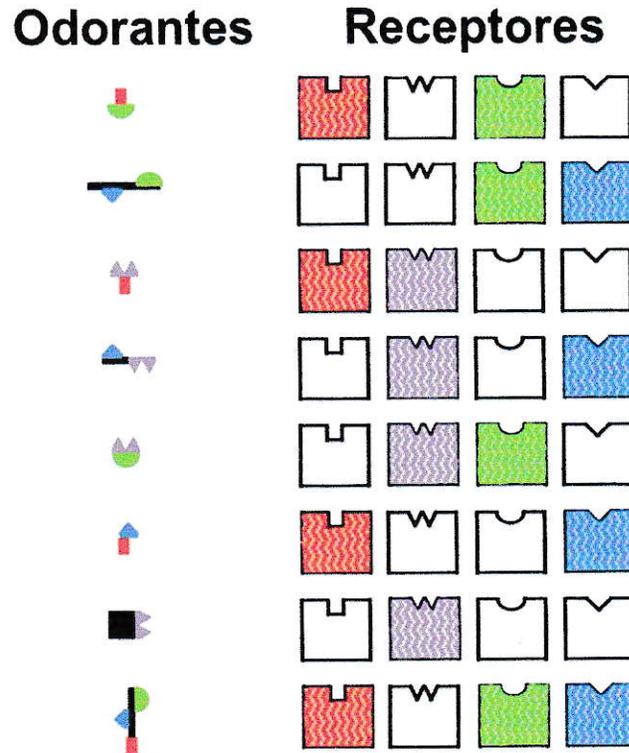
La transducción olfatoria comienza con la activación de un receptor de odorante que activa a una proteína G<sub>olf</sub> que activa a su vez a una enzima adenilato ciclasa tipo III (ACIII), la cual cataliza la producción de AMPc, abriendo el canal gatillado por nucleótidos cíclicos (CNG), por el cual entra Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>, despolarizando la membrana. La entrada de Ca<sup>2+</sup> abre a su vez un canal de Cl<sup>-</sup> que despolariza aún más a la membrana debido a un flujo de salida de Cl<sup>-</sup>.

#### **D. El código del odorante.**

¿Cómo está representada una molécula de odorante en el EOP que contiene millones de NQSs (Ma, 2012) y que expresan cerca de 1.000 ROs? La cualidad del odorante está codificada por la combinación de ROs específicos contenidos en sus respectivas NQSs. Aunque una única NQS expresa un único tipo de RO, ésta puede reconocer a múltiples odorantes con diferente sensibilidad (*Figura 5*) (Ma, 2012). Adicionalmente, un único odorante puede ser reconocido por múltiples receptores que detectan diferentes características moleculares. Según esto, un odorante a concentraciones elevadas produce una respuesta fuerte en una NQS individual y activará a otros receptores con una afinidad más baja (Axel, 2005). Esta estrategia basada en la combinación de múltiples receptores permite al sistema olfativo tener prácticamente una capacidad ilimitada de detección y discriminación de odorantes (Axel, 2005).

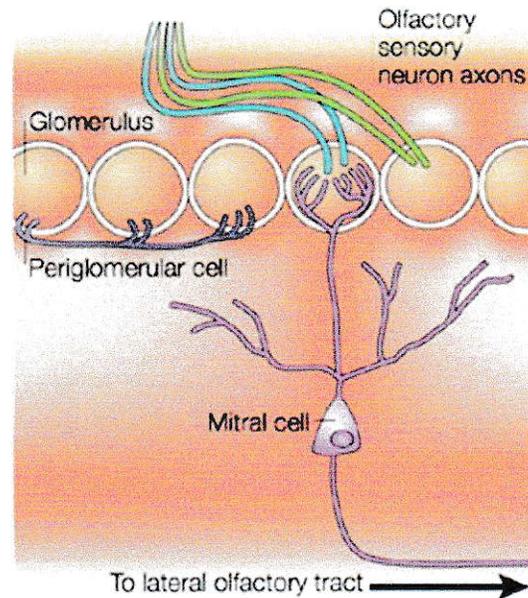
#### **E. Procesamiento a nivel central.**

Las NQSs que expresan un mismo RO se encuentran dispersas en el EOP, y sus axones generalmente proyectan solo a uno o dos glomérulos (Ressler y cols., 1994, Vassar y cols., 1994, Rawson y cols., 2000, Mombaerts, 2006). Un único glomérulo (aproximadamente 5.000 NQSs por glomérulo en roedores; Wilson y Mainen, 2006) es inervado por 25 a 50 neuronas de proyección (mitrales y en penacho), cada una de las cuales extiende una única dendrita primaria al glomérulo (*Figura 6*). La alta tasa de convergencia puede ayudar a amplificar señales débiles, incrementando la razón señal/ruido y expandiendo el rango dinámico de la respuesta del odorante (Wilson y Mainen, 2006). En



**Figura 5. Modelo que representa la diversidad de receptores olfatorios.**

La información del odorante se encuentra codificada por la combinación de varios ROs – cada cual correspondiente a una neurona- a nivel epitelial. En este modelo, los receptores que se muestran en color son aquellos que reconocen el olor que induce la actividad neuronal, del odorante de la izquierda (Modificado de Malnic y cols., 1999).



**Figura 6. Representación del relevo de la señal eléctrica en el bulbo olfatorio principal.**

Corte transversal del bulbo olfatorio principal. El bulbo está dispuesto en cinco capas: (1) Capa de fibras nerviosas: es la más superficial y en ella están los axones de las neuronas olfatorias primarias en la mucosa nasal. (2) La capa glomerular contiene neuropilas esféricas llamadas glomérulos esféricos en los cuales tiene lugar una convergencia considerable entre los axones de las neuronas olfatorias primarias y las dendritas de las células en penacho y las células mitrales. (3) La capa plexiforme externa contiene principalmente los cuerpos de las células en penacho. (4) La capa de células mitrales es una capa única de grandes cuerpos de células mitrales. (5) La capa de células granulosas (interneuronas inhibitoras) y axones mielínicos de neuronas secundarias. (Mombaerts, 2004).

el bulbo olfatorio principal (BOP) también encontramos células periglomerulares (PG), interneuronas inhibitorias que también reciben aferencias de las NQSs. Los axones de las células mitrales/empenacho (M/T) forman el tracto olfatorio lateral, que proyecta a la corteza olfatoria primaria, incluyendo el núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme y la corteza entorrinal (Lledo y cols., 2005; Haberly, 2001; Gire y cols., 2013). Las señales eléctricas son directamente relevada a la corteza superior, incluyendo la corteza orbitofrontal (Finger y cols., 2000).

El BOP también está conectado al sistema límbico, constituido por los múltiples lóbulos de la amígdala, presumiblemente involucrada en los aspectos emocionales asociados al olfato (Thompson y cols., 2012). Adicionalmente, las vías olfativas también transportan información quimiosensorial al hipotálamo, que tiene un rol clave en los comportamientos de reproducción, agresividad y alimentación (Boehm y cols., 2005; Yoon y cols., 2005). Diversos estudios demuestran que el EOP y el BOP responden tanto a odorantes como a feromonas (Spehr y cols., 2006; Lin y cols., 2004; Mandiyan y cols., 2005; Wang y cols., 2006). Esto sugiere que aquellos mamíferos que no poseen un órgano vomeronasal funcional, como los primates, podrían usar el sistema olfatorio principal como sensor feromonal, si es que responden a feromonas.

## **F. Feromonas**

El término feromonas proviene del griego "*pherin*" (llevar o transferir) y "*hormon*" (estimular o excitar), y fue introducido en el año 1959 por Peter Karlson y Martin Luscher (Karlson y Luscher, 1959) para denominar sustancias específicas biológicamente activas "que son secretadas al exterior por un individuo y recibidas por un segundo individuo de la

misma especie, en la cual generan una reacción específica, por ejemplo, un comportamiento definido o un proceso de desarrollo". En el mismo año se identificó la primera feromona en insectos, el bombicol, el cual es liberado por la hembra del gusano de seda (*Bombyx mori*) provocando la atracción del macho (Butenandt y cols., 1959).

Las feromonas tienen una gran variabilidad química, por lo que se ha preferido agruparlas de acuerdo a su función más que a su estructura química. Por ejemplo, trazas de ciertas feromonas permiten atraer a una misma especie, mientras que otras feromonas actúan como alarmas permitiendo alertar a una misma especie acerca de un peligro externo y en algunos casos provocar comportamientos agresivos (McClintock, 1998). Para los odorantes en cambio se han propuesto diferentes categorizaciones de olores primarios, entre otros este, que se basa en siete olores primarios (almizclado, pútrido, floral, picante, mentolado, alcanforado y etéreo).

#### **G. Anatomía del órgano vomeronasal**

El epitelio vomeronasal es una estructura tubular encerrada en una cápsula de protección ósea localizada en la base del septum nasal (*Figura 1*) (Doving y Trotier, 1998; Jakupovic y cols., 2008). Dada su naturaleza relativamente aislada, el epitelio vomeronasal no puede ser alcanzado por la corriente de aire que fluye regularmente través de la cavidad nasal, por lo que las moléculas deben ser atrapadas en el moco que lo cubre para ser transportadas dentro del lumen del órgano.

En disposición lateral al lumen hay vasos sanguíneos y senos paranasales, innervados por el sistema nervioso autónomo, que inducen vasodilatación y vasoconstricción, produciendo una acción de bombeo que facilita el acceso de las moléculas provenientes del

aire al lumen (Meredith y cols., 1980; Meredith y O'Connell, 1979). El lado medial, está revestido por un epitelio pseudoestratificado compuesto por tres tipos de células, tal como el EOP: las neuronas sensoriales, las células de apoyo, y las células basales. Las neuronas del vomeronasal forman dos subpoblaciones superpuestas, basal y apical, mientras que las células de soporte se encuentran en la capa más superficial del epitelio sensorial. Las células basales están localizadas a lo largo de la membrana basal del epitelio sensorial, en el límite con el epitelio no sensorial (Giacobini y cols., 2000). En el ratón, el epitelio vomeronasal se encuentra completamente desarrollado a los dos meses de vida (Horowitz y cols., 1999).

Los axones de las NQSs del OVN conectan con las células mitrales y en empenacho del bulbo olfatorio accesorio (BOA), las que, a diferencia de las del epitelio olfatorio principal, conducen los impulsos eléctricos evocados por la feromonas a la amígdala medial (Boehm y cols., 2005; Restrepo y cols., 2004).

#### **H. Receptores de feromonas del epitelio vomeronasal**

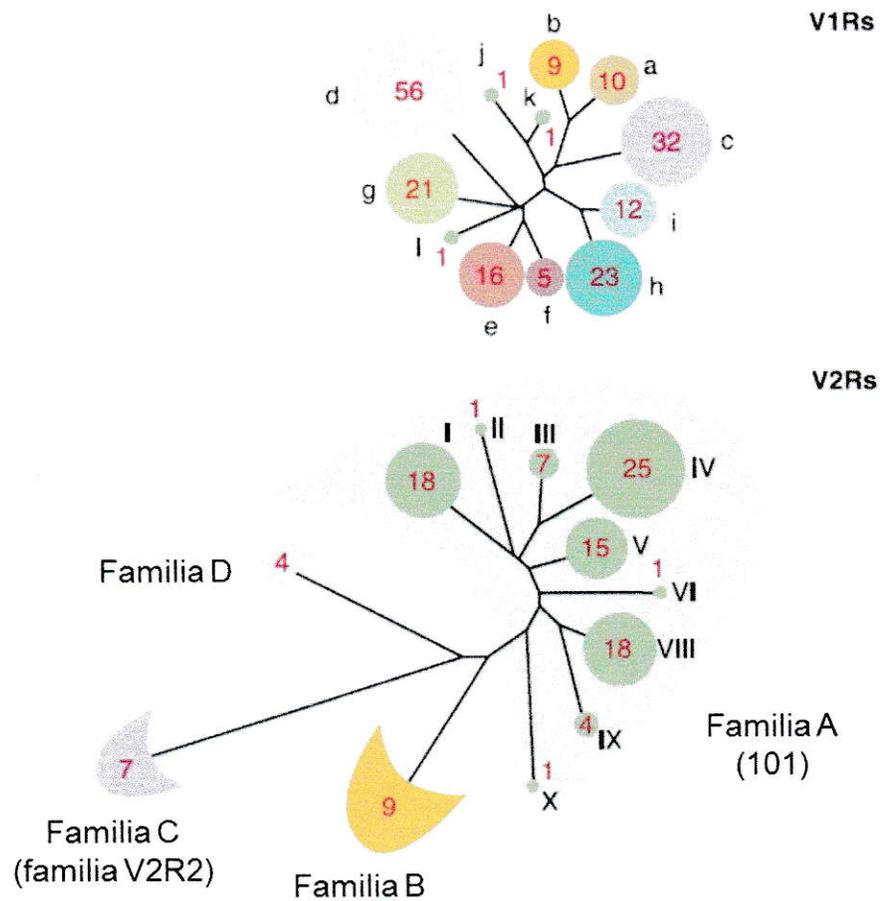
El sistema olfativo accesorio comprende al menos dos subpoblaciones diferentes de receptores vomeronasales (RV), pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, al igual que los ROs expresados en el EOP. Las NQSs de la parte apical del neuroepitelio vomeronasal expresan los receptores VIRs. El genoma de ratón contiene 308 genes de receptores VIR, pero solo 187 de estos son funcionales (Shi y Zhang, 2007). En humanos solo hay cinco genes para receptores VIR, los cuales se expresan en el epitelio olfatorio principal (Rodriguez y cols., 2000; Rodriguez y Mombaerts, 2002). De manera

similar al patrón de expresión de los ROs en el EOP, cada NQS del OVN expresa un único alelo de un solo gen de la familia V1R (Dulac y Torello, 2003).

Las NQSs basales del OVN expresan a su vez otro tipo de receptor, llamado V2R (Dulac y Torello, 2003, Halpern y Martínez-Marcos, 2003). En el genoma del ratón hay 279 genes de receptores V2R, pero solo 121 son funcionales (*Figura 7*) (Shi y Zhang, 2007; Young y Trask, 2007).

### **I. Transducción feromonal en el OVN.**

La cascada de quimiotransducción en el órgano vomeronasal aún no se conocen completamente, pero está bien establecido que la estimulación con feromonas causa la despolarización de la membrana e incrementa la tasa de disparos de potenciales de acción en las NQSs del OVN (Inamura y Kashiwayanagi, 2000; Inamura y cols., 1997; Leinders-Zufall y cols., 2004; Leinders-Zufall y cols., 2000; Lucas y cols., 2003). Los dos subconjuntos de neuronas del epitelio vomeronasal, apicales y basales, presentan distintos componentes en su cascada de transducción. Las NQSs apicales expresan receptores vomeronasales de la familia V1R, acoplados a proteínas  $G_{\alpha_{i2}}$ , mientras las neuronas basales expresan receptores de la familia V2R, acoplados a proteínas  $G_{\alpha_o}$  (Jia y cols., 1997; Jia y Halpern, 1996; Sugai y cols., 1997). Se ha reportado que la orina del macho induce producción de inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) a través de una vía de señalización que involucra tanto a la proteína  $G_{\alpha_{i2}}$  como a la proteína  $G_{\alpha_o}$  (Krieger y cols., 1999). La activación de la proteína  $G_{\alpha_{i2}}$  es estimulada solo por componentes lipofílicos volátiles, y la activación de la proteína  $G_{\alpha_o}$  es estimulada solo por proteínas de mayor tamaño de la orina, como  $\alpha_2$ -globulina. Ratones *knockout* tanto para la proteína  $G_{\alpha_{i2}}$  como para  $G_{\alpha_o}$  muestran



**Figura 7. Filogenia de receptores funcionales del OVN de ratón.**

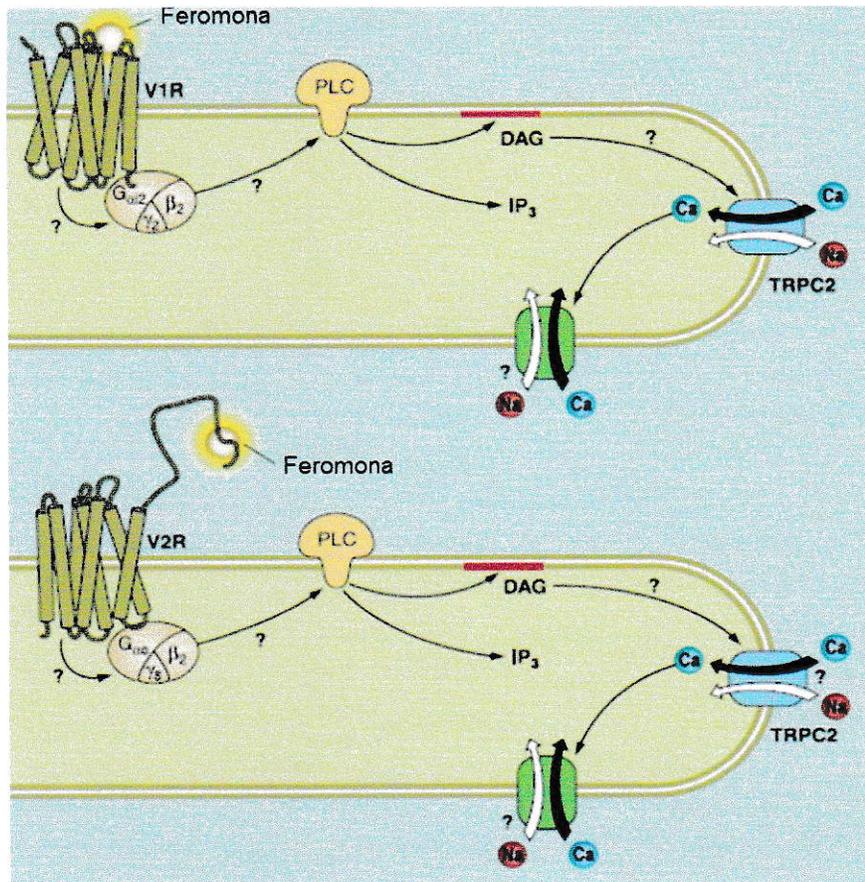
Arriba: árbol filogenético de receptores V1Rs muestra 12 subfamilias filogenéticamente aisladas. Abajo: árbol filogenético de las cuatro familias de receptores V2Rs funcionales. El número de receptores de cada rama y familia se muestra en rojo (Modificado de Tirindelli y cols., 2009).

conductas de tipo feromonal alteradas (Norlin y cols., 2003; Tanaka y cols., 1999), y cada línea de ratones muestra una reducción en el tamaño de la capa neuronal donde se expresa originalmente la proteína  $G_\alpha$  respectiva, indicando que la actividad mediada por proteína G es requerida para la sobrevivencia de las NQSs del OVN.

Otros estudios muestran respuestas eléctricas, producción de  $IP_3$ , y entrada de calcio en NQSs del OVN cuando son estimuladas con feromonas (Krieger y cols., 1999; Kroner y cols., 1996), y estas son inhibidas por U73122, inhibidor de la PLC (Holy y col., 2000; Spehr y cols., 2002), sugiriendo que la PLC juega un rol fundamental en la vía de quimiotransducción en las NQSs del OVN. Dado que  $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha o}$  se expresan predominantemente en neuronas del OVN y usualmente no están involucradas en la activación de PLC (Clapham y Neer, 1997), se ha propuesto que proteínas  $G_{\beta\gamma}$  podrían jugar un rol importante en los procesos de transducción del epitelio vomeronasal. (Runnenburger y cols., 2002). Además, otro estudio mostró que la proteína  $G\alpha q/11$ , que es capaz de activar la PLC directamente, también es expresada en una subpoblación de neuronas del OVN (Wekesa y cols., 2003). Resultados obtenidos por este grupo muestran que las feromonas encontradas en la orina del macho activan neuronas del OVN de hembras, a través de un receptor acoplado a la proteína  $G\alpha q/11$  que incrementa los niveles de  $IP_3$  (Wekesa y cols., 2003).

Además, el canal iónico TRPC2, miembro de la superfamilia de canales de potencial de receptor transitorio (TRP; Venkatachalam y Montel, 2007), es expresado en las microvellosidades de las neuronas tanto apicales como basales del OVN (Menco y cols., 2001; Murphy y cols., 2001; Liman, 2003), y juega un rol importante en el proceso de

transducción de algunas de estas. El mecanismo propuesto para la activación del canal TRPC2 en las NQs del OVN es similar al involucrado en la cascada de señalización de los fotorreceptores de *Drosophila* que envuelve una cascada de diacilglicerol, la cual lleva a la apertura de los canales de luz-dependientes TRP y TRPL (Hardie, 2007; Minke y Parnas, 2006). En el caso de las NQs del OVN las feromonas activarían a un receptor acoplado a proteína G, que estimula la PLC, y que produce al mensajero lipídico diacilglicerol (DAG) (Lucas y cols., 2003) y posiblemente también ocurre producción de ácidos grasos poli insaturados tales como el ácido araquidónico (Spehr y cols., 2002; Zhang y cols., 2008) y ácido linolénico (Spehr y cols., 2002) a través de una enzima lipasa (*Figura 8*). El ratón *knockout* del canal TRPC2 presenta una reducción significativa de la respuesta electrofisiológica de las NQs del OVN a orina o sus componentes volátiles (Kelliher y cols., 2006; Leypold y cols., 2002; Muller-Schwarze, 1979). Además, los ratones *knockout* para TRPC2 muestran diversas conductas anormales (Keverne, 2002; Leypold y cols., 2002; McCarthy y Auger, 2002), indicando que el canal TRPC2 puede ser un componente importante de la vía de quimiotransducción feromonal. No obstante, la pérdida genética del TRPC2 no suprime completamente la respuesta a feromonas en el OVN, ya que registros electrofisiológicos muestran que las neuronas basales del ratón mutante siguen respondiendo a péptidos ligando de moléculas de MHC (Kelliher y cols., 2006). Estos estudios sugieren que al menos una parte de las neuronas basales usan en algunos estímulos feromonales una vía de quimiotransducción que no involucra al canal TRPC2.



**Figura 8. Vías de quimiotransducción en el epitelio vomeronasal.**

La unión de moléculas de feromonas a los receptores vomeronasales en las microvellosidades activa la cascada de transducción que involucra en algunos casos al receptor V1R (arriba), acoplado a la proteína  $G_{\alpha i}$  en neuronas apicales, o en otros casos al receptor V2R (abajo), acoplado a la proteína  $G_{\alpha o}$  en neuronas basales. El complejo  $\beta\gamma$  activa la PLC, que genera IP<sub>3</sub> y DAG. La apertura del canal TRPC2 por DAG permite el flujo de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, causando la despolarización de la membrana. Adicionalmente, se produciría la activación de un canal catiónico selectivo activado por calcio (se desconoce su identidad), que podría estar involucrado en la cascada de transducción. El canal TRPC2 pareciera ser el canal principal en la quimiotransducción de neuronas que expresan el receptor V1R, mientras su rol en las neuronas que expresan el receptor V2R es incierto (Tirindelli y cols., 2009).

Un estudio mostró que un canal catiónico activado por calcio a concentraciones de 0.5 mM es expresado en NQs del OVN de hamster (Liman, 2003). Este canal es permeable a Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> y es bloqueado por ATP y AMPc, características similares al canal TRPM4 (Nilius y Vennekens, 2006). Estas propiedades hacen que este canal sea un buen candidato a estar directamente involucrado en la quimiotransducción sensorial, potencialmente amplificando la respuesta sensorial primaria. Por el momento, la naturaleza molecular de este canal y su relación con TRPC2 o con la producción de IP<sub>3</sub> no han sido dilucidadas.

#### **J. Transducción feromonal en el EOP.**

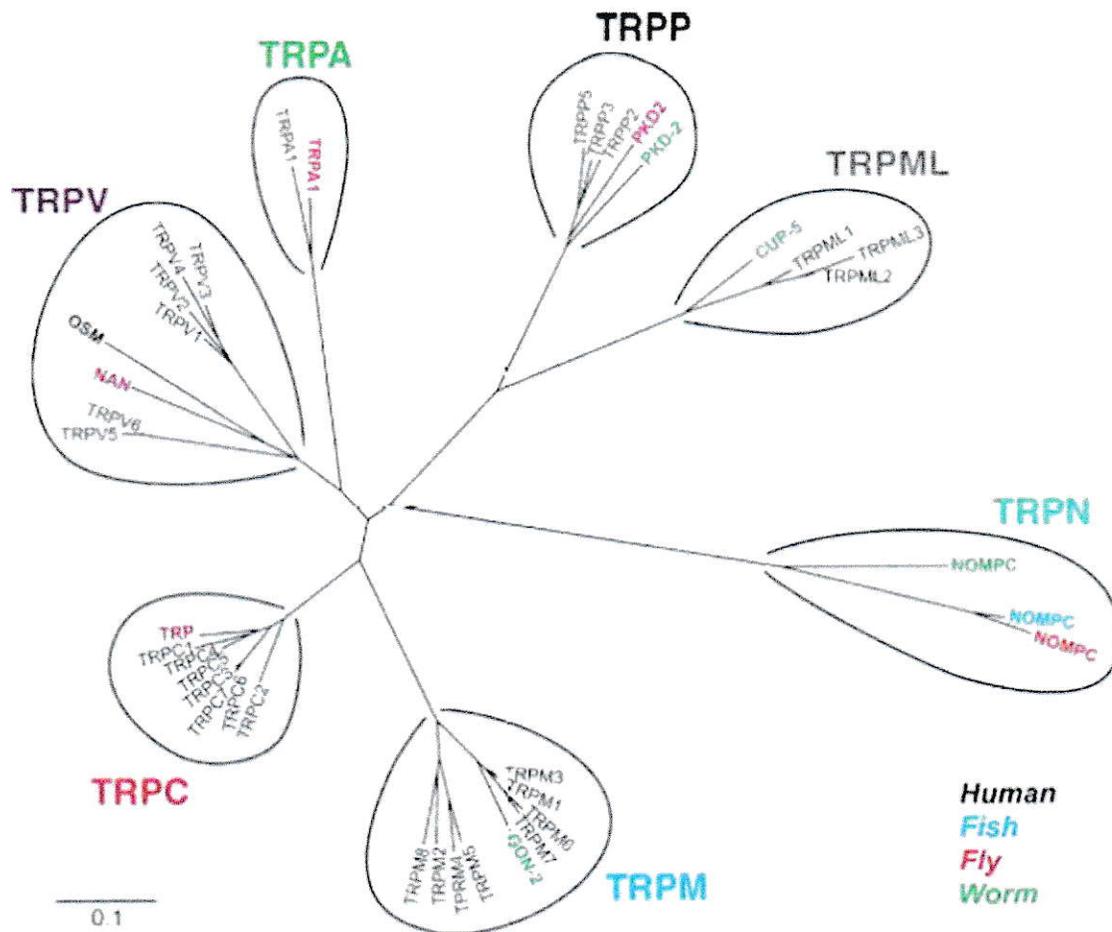
Recientemente se han registrado respuestas a feromonas en el EOP usando la técnica de registros de campo conocido como electroolfatograma (EOG), que mide respuestas poblacionales (Lin y cols., 2004). Otros autores han identificado en el EOP de ratón una clase de receptor quimiosensorial que reconoce aminas que se encuentran en la orina de estos animales (Liberles y Buck, 2006), sugiriendo que el EOP podría también estar involucrado en la detección de feromonas (Mandiyan y cols., 2005). Adicionalmente, se ha visto que ratones *knockout* de la subunidad A2 del canal CNG tienen suprimidas las respuestas evocadas por odorantes, pero las respuestas a feromonas son suprimidas solo parcialmente (Lin y cols., 2004). Esto sugiere que una subpoblación de NQs del EOP estaría especializada en la respuesta a feromonas a través de un mecanismo diferente al canónico, que no involucraría al canal CNG. Por otra parte, resultados farmacológicos sugieren un posible rol de la vía de señalización de la PLC en las neuronas del EOP involucradas en la detección de feromonas (Clapham y cols., 2005); de ser así, debería

ocurrir liberación de calcio de almacenes internos. Sin embargo, los cilios de las NQSS donde ocurre la quimiotransducción no cuentan con un sistema de endomembranas, por lo que si esta vía de señalización se encuentra presente debería ocurrir una difusión del calcio liberado de almacenes internos desde el botón dendrítico hasta los cilios, donde se encuentran los otros componentes de la quimiotransducción, o bien que la quimiotransducción en esta subpoblación de NQSS ocurra en el botón dendrítico. Otra posibilidad es que la quimiotransducción sea parecida a la de las NQSS del órgano vomeronasal, donde la vía de la PLC está involucrada, y la entrada de calcio pareciera ocurrir por un canal permeable a calcio (TRPC2), que es activado por diacilglicerol (DAG) (Zhang y cols., 2009). Entonces, podría ser que el canal TRPC2 también esté siendo expresado en un subpoblación de NQSS del EOP, y que el calcio entre por el canal TRPC2 en vez del canal CNG. Por otra parte, también se ha sugerido que la respuesta a feromonas ocurriría únicamente a través de la vía del AMPc, ya que ratones *knockout* de la ACIII tienen suprimida completamente la respuesta a feromonas en registros de EOG (Wang y cols., 2006); además, estos ratones presentan comportamientos de tipo feromonal deteriorados. La población de NQSS del EOP que respondería selectivamente a feromonas, y el mecanismo de quimiotransducción involucrado en esta respuesta eran hasta ahora desconocidos.

#### **K. Superfamilia de canales iónicos TRP y su participación en los sistemas sensoriales.**

Los canales de potencial de receptor transitorio (TRP) son una superfamilia de canales tetraméricos con seis dominios transmembrana por subunidad (Pedersen y cols.,

2005, Wu y cols., 2010). El primer canal TRP fue descubierto en la *Drosophila*. En el mutante *trp*, la ausencia del canal provoca que las células fotorreceptoras respondan a la luz de manera transitoria en vez de persistente (Cosens and Manning, 1969, Hardie and Minke, 1992) a un estímulo prolongado. Los miembros de la superfamilia de canales TRP pueden ser agrupados dentro de siete subfamilias (*Figura 9*): TRPC (Canónico), TRPV (Vaniloide), TRPM (Melastatina), TRPA (Anquirina), TRPN (*Drosophila* NOMPC), TRPP (Policistina, o PKD), y TRPML (Mucolipina, o MCOLN). Al igual que el miembro fundador de la superfamilia, muchos canales TRP tienen roles importantes en transducción sensorial. El TRPV1, por ejemplo, se encuentra involucrado en la nocicepción, que consiste en la transducción de estímulos dolorosos y estímulos térmicos. También está involucrado en la respuesta a compuestos vaniloides, como la capsaicina, y es sensible a altas temperaturas (aproximadamente 43°C) y pH ácido (aproximadamente 5.9) (Pedersen y cols., 2005). Es altamente expresado en los terminales nerviosos periféricos y espinales de neuronas de los ganglios raquídeos (GR) y del ganglio trigeminal (GT), y también en células no neuronales (Pedersen y cols., 2005). TRPA1, el único miembro de la subfamilia TRP de anquirina, también participa en nocicepción y mecanosensorialidad, y es expresado en neuronas del GR y del GT (Andrade y cols., 2011). Por otra parte, el canal TRPM8 es activado por mentol y, en contraste al TRPV1, a voltajes fisiológicos es activado en respuesta a bajas temperaturas (8-28°C) (Pedersen y cols., 2005). Como mencioné anteriormente, el canal TRPC2 ha sido indicado como el canal involucrado en la quimiotransducción en el OVN (Zufall y cols. 2005). El canal TRPM5, a su vez, es dependiente de temperatura, siendo activado moderadamente a temperaturas elevadas (Talavera y cols., 2005). Además, cumple



**Figura 9. Árbol filogenético de la superfamilia de canal TRP.**

Se muestran las subfamilias de los canales TRP, con cada uno de los miembros identificados en mamíferos. Las múltiples alineaciones en el árbol filogenético ilustran la relación entre las diferentes subfamilias de los canales TRPs. Los fenogramas se generaron de forma independiente para cada subfamilia. De las familias TRPN y TRPY no existen todavía miembros en mamíferos, y TRPC2 es un pseudogen en primates (Modificado de Pedersen y cols., 2005).

un rol fundamental en la quimiotransducción gustativa de los gustos dulce, amargo y umami (Zhang y cols., 2003, Damak y cols., 2006).

#### **L. El canal TRPM5 en el EOP.**

El canal catiónico TRPM5, perteneciente a la subfamilia de canales TRPM, se expresa en una subpoblación de NQSS y en un subconjunto de células con microvellosidades del EOP, según lo observado mediante inmunocitoquímica en ratones que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor de TRPM5 (TRPM5-GFP). Ambas subpoblaciones presentan morfologías completamente diferentes; las NQSS presentan la morfología característica de las neuronas olfativas, es decir, una dendrita con cilios y un axón, mientras que las células con microvellosidades carecen de neuritas, y cilios (Lin y cols., 2008; Hansen y Finger, 2008). Debido a que no son receptores sensoriales, las células con microvellosidades TRPM5<sup>+</sup> no fueron estudiadas en este proyecto (Hansen y Finger, 2008; Ogura y cols, 2011).

El canal TRPM5 es un canal catiónico monovalente no selectivo, que es directamente activado  $[Ca^{2+}]_i$  en un rango de concentraciones de 0.3 a 1  $\mu$ M. Adicionalmente, es desensibilizado ante una exposición prolongada de  $Ca^{2+}_i$  a concentraciones superiores a 0.3  $\mu$ M, y es modulado por temperatura y voltaje (Talavera y cols., 2005). El mecanismo de quimiotransducción de las NQSS del EOP que expresan TRPM5 no se ha establecido (Lin y cols., 2007). Sin embargo, TRPM5 es altamente expresado en el sistema gustativo (Perez y cols., 2002), en donde se sabe que es activado por  $Ca^{2+}_i$  a través de un mecanismo de quimiotransducción similar al de las neuronas del órgano vomeronasal, el cual involucra a la vía de señalización de la PLC (Zhang y cols.,

2003; Clapp y cols., 2006). Las NQs TRPM5<sup>+</sup> del EOP podrían presentar una vía similar a la de las neuronas del órgano vomeronasal y a la de las células del gusto; si esto fuera así podría explicar los resultados obtenidos en el *knockout* del canal CNG, el cual no tienen suprimidas las respuestas a feromonas completamente en registros de EOG (Lin y cols., 2004). Sin embargo, la quimiotransducción olfativa ocurre en los cilios en donde no hay un sistema de endomembrana, por lo que sería necesario que el canal TRPM5 estuviera en el botón dendrítico o bien que ocurra una difusión rápida del calcio interno desde el botón a los cilios. Otra posibilidad sería que el canal TRPM5 colocalizara con el canal CNG en los cilios de las NQs, y la activación del canal TRPM5 se debería a la entrada de calcio por este canal. Resultados de inmunohistoquímica del epitelio olfatorio principal sugieren que el canal TRPM5 podría estar presente en células que también expresan el canal CNG (Hansen y Finger, 2008; Lin y cols., 2007).

Los ratones *knockout* para el canal TRPM5 tienen una respuesta electrofisiológica normal a odorantes y presuntas feromonas en registros de electroolfatograma, sin embargo, el porcentaje de NQs que expresan el canal TRPM5 es muy bajo (aproximadamente 5%). Como la técnica de electroolfatograma registra la respuesta de una población de NQs, no se esperaría encontrar diferencias significativas en las respuesta a odorantes o feromonas al comparar el ratón silvestre con el ratón *knockout* del canal TRPM5 (Lin y cols., 2007). Además, en este mismo trabajo se observó una activación de los glomérulos GFP positivos en el bulbo olfatorio principal tras ser tratados con presuntas feromonas, tales como 2,5-dimetilpirazina (DMP), y orina de ratón, a través de la detección de actividad neuronal por la expresión de la proteína c-Fos en las células periglomerulares (Lin y cols., 2007).

Recientemente se ha establecido, con el uso de trazadores neuronales, que las NQSS que expresan el canal TRPM5 hacen sinapsis con un subconjunto de células mitrales del BOP que proyectan directamente a la amígdala medial, tradicionalmente considerada blanco exclusivo del BOA. Las neuronas mitrales que proyectan desde el BOP a la amígdala medial también muestran activación en respuesta a la exposición a presuntas feromonas, estableciendo un rol directo del BOP en el procesamiento de feromonas (Thompson y cols., 2012).

Mientras la quimiotransducción para odorantes en las NQSS se encuentra bien estudiada, la quimiotransducción para feromonas en el epitelio olfatorio principal aún no ha sido completamente esclarecido (Baum, 2012; Munger y cols., 2009). En esta tesis demostré la presencia de una población de NQSS especializadas en la detección de feromonas en el epitelio olfatorio principal, correspondientes a aquellas que expresan el canal TRPM5. También, caractericé la vía de quimiotransducción a feromonas en NQSS que expresan altos niveles de GFP aisladas de ratones TRPM5-GFP, que expresan GFP bajo el promotor del canal TRPM5 usando inmunocitoquímica, registros eléctricos de *loose-patch*, imágenes de  $Ca^{2+}$  y experimentos de conducta. Este trabajo provee una fuerte evidencia que apoya la idea que el canal TRPM5 está involucrado en la quimiotransducción de feromonas en el EOP. Se muestra que las NQSS que expresan TRPM5 cuando son estimuladas con feromonas producen la apertura del canal CNG que media el ingreso del  $Ca^{2+}$  al interior del cilio, y este  $Ca^{2+}$  a su vez activa al canal TRPM5. Adicionalmente, las NQSS aisladas de los ratones *knockout* del TRPM5 que deberían expresar TRPM5 pero no que lo hacen porque carecen del gen, no responden a la estimulación con feromonas en los registros de *loose-patch* y no presentan el efecto *Lee Boot* en el ciclo estral de las hembras

cuando se encuentran en cajas grupales (Ma et al., 1998), apoyando fuertemente la idea de que el canal TRPM5 está involucrado en la detección de feromonas, ya que la carencia de este produce un defecto en la regulación del ciclo estral de las hembras.

## **HIPOTESIS DE TRABAJO**

El epitelio olfatorio principal de ratón contiene una subpoblación de neuronas quimiosensoriales que responden a feromonas a través de un mecanismo que involucra al canal TRPM5.

## **OBJETIVOS GENERAL**

Establecer mediante técnicas si el canal TRPM5 participa en la respuesta a feromonas en el epitelio olfatorio principal de ratón y caracterizar el mecanismo de quimiotransducción que lo activa.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Identificar las células que responden a las presuntas feromonas en el EOP, y determinar si estas corresponden a aquellas que expresan TRPM5 en el EOP.
- 2.- Determinar el mecanismo de quimiotransducción de feromonas de las NQs que expresan el canal TRPM5.

## MATERIALES Y METODOS

### A. Animales.

Utilicé ratones TRPM5-GFP mantenidos como una colonia homocigota y ratones TRPM5 "*knockout*" con fondo genético C57BL/6, ambos enviados por el Dr. Diego Restrepo a Chile, los cuales fueron previamente donados por el Dr. Robert Margolskee. Utilicé tanto hembras como machos de 2-6 meses de edad, se les proporcionó comida y agua *ad libitum* y fueron mantenidos en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La colonia fue renovada cada 4 meses. Los animales son mantenidos en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo los criterios éticos propios del Bioterio. El constructo TRPM5-GFP contiene, del 5' al 3': 11 Kb de secuencia flanqueante 5' del gen *Trpm5* de ratón, el exón 1 (no traducido) del *Trpm5*, el intrón 1, la región no traducida del Exón 2, y eGFP (Clapp y cols., 2006). El ratón TRPM5 *knockout* (Damak y cols., 2006) fue obtenido por recombinación homóloga, utilizando un constructo diseñado para remover la región que contiene el promotor y los exones del 1 al 4 que incluyen el sitio de inicio de la traducción dentro del exón 2 del gen *Trpm5*. Se realizó la cruce TRPM5-KO x TRPM5-GFP, de manera de obtener un ratón que expresara GFP bajo el promotor de *Trpm5* y que careciera del canal TRPM5, de manera de poder evaluar la pérdida de función de TRPM5 en aquellas células que deberían expresarlo. GFP fue usado para identificar las células que expresan fluorescencia bajo el promotor de *Trpm5*, tanto en ratones TRPM5-GFP como en ratones TRPM5-KO-GFP.

## B. Soluciones.

La composición de las soluciones usadas en los diferentes experimentos se resume en la siguiente tabla (en mM):

**TABLA 1**

Componentes	Solución Extracelular	Solución Alta en Ca <sup>2+</sup>	Solución 0 Ca <sup>2+</sup>	Solución Intracelular
NaCl	145	145	145	-
KCl	5	5	5	120
MgCl <sub>2</sub>	1	1	3	1
CaCl <sub>2</sub>	1	3	0,5	1
Na-piruvato	1	1	1	-
HEPES	10	10	10	10
EGTA	-	-	1	2
D-glucosa	5	5	5	-
Na <sub>2</sub> GTP	-	-	-	0,1
Mg-ATP	-	-	-	1
pH	7,4	7,4	7,4	7,4
pCa	-	-	8	7,5
Osm	290	290	290	290

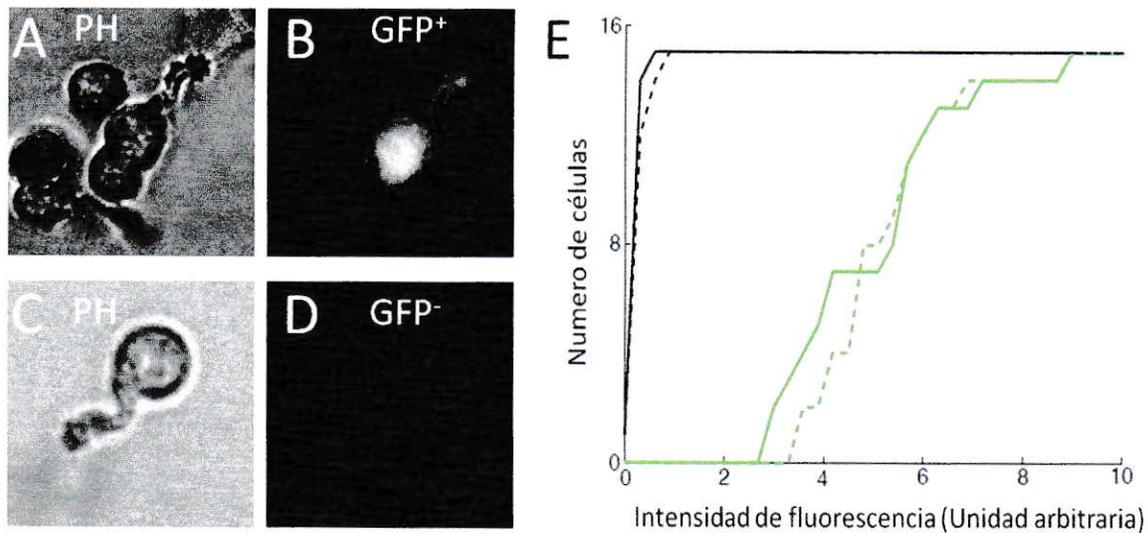
## C. Disociación de las neuronas quimiosensoriales.

Las neuronas aisladas del epitelio olfatorio de ratones TRPM5-GFP y TRPM5-KO-GFP fueron obtenidas mediante el siguiente procedimiento (modificado de Sanhueza y cols., 2000; y Schmachtenberg y cols., 2003), que no requiere del uso de enzimas proteolíticas. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical o por sobredosis de inhalación de CO<sub>2</sub>, de acuerdo a las normas aprobadas por Conicyt (Manual de normas de Conicyt, 2008). Las turbinas de ambas fosas nasales fueron removidas y colocadas en una solución extracelular, permaneciendo en ella 10 minutos, para eliminar el mucus del epitelio olfatorio. La mucosa olfatoria fue extraída de las turbinas con una pinza. Después de limpiar la solución, el epitelio fue cortado en trozos de ~1 mm<sup>2</sup>, los que eran

trasladados a una placa de Petri de 35 mm con 3 mL de solución extracelular. Luego de esto se trasladaban a un tubo falcón de 15 mL, se agregaban 3 mL y se los hacía pasar suavemente por la punta pulida de una pipeta Pasteur. Luego de repetir esta operación unas 20 veces, 1 mL de la suspensión de células era trasladada a la cámara de registro. Para el órgano vomeronasal el protocolo es el mismo pero en vez de extraer las turbinas de ambas fosas nasales se removió el órgano vomeronasal completo de acuerdo al protocolo de Brechbühl y cols., 2011. Este procedimiento permitía obtener un número elevado de neuronas aisladas tanto del EOP como del OVN en que era posible distinguir los cilios de las NQSs del EOP y las microvellosidades de las NQSs del OVN, las cuales se mantenían en buenas condiciones durante al menos dos horas. Las células TRPM5<sup>+</sup> y TRPM5<sup>-</sup> fueron separadas de acuerdo a la intensidad de fluorescencia emitida en el canal verde, como se muestra en la *Figura 10*.

#### **D. Lista de reactivos.**

Los reactivos utilizados en los diferentes experimentos se resumen en la tabla 2. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de ~22°C. Los asteriscos indican la referencia en la cual fueron descritos: \*Leinders-Zufall y cols., 2000; Wang y cols., 2007; Zufall y Leinfers-Zufall, 2007, \*\*Dorris y cols., 1995.



**Figura 10. Histograma acumulativo de la intensidad de emisión de fluorescencia verde.**

(A) y (B) Imágenes de NQs TRPM5<sup>+</sup> bajo contraste de fase (PH) (A) y bajo óptica de fluorescencia GFP (B). (C) y (D) Imágenes de NQs TRPM5<sup>-</sup> bajo contraste de fase (C) y bajo óptica de fluorescencia GFP (D). (E) Histograma acumulativo de la intensidad de emisión de fluorescencia verde en NQs GFP<sup>+</sup> aisladas de ratones TRPM5-GFP (línea verde sólida) y ratones TRPM5-KO-GFP (línea verde punteada) y NQs GFP<sup>-</sup> aisladas de ratones TRPM5-GFP (línea negra sólida) y ratones TRPM5-KO-GFP (línea negra punteada). La intensidad de fluorescencia fue medida en NQs aisladas con un microscopio confocal.

TABLA 2

Reactivo	Tipo	Procedencia
TPPO (óxido de trifenilfosfina)	Bloqueador	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
LCD (L- <i>cis</i> -diltiazem)	Bloqueador	Abcam Biochemicals (Cambridge, MA)
NFA (ácido niflúmico)	Bloqueador	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
isoamil acetato (3-metil-1-butil acetato)	Odorante	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
citralva (3,7-dimetil-2,6-dienitrilo)	Odorante	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
cineol (1,8-cineol)	Odorante	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
lilial (3-(4-ter-butilfenil)-2-metilpropanal)	Odorante	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
pino (5-bromo-N-(4,5-dihidro-1-H-imidazol-2-il)-quinoxalin-6-amina)	Odorante	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
pimienta negra (piperidina)	Odorante	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
2-heptanona	Feromona de ratón *	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
DMP (2,5-dimetilpirazina)	Feromona de ratón *	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
farneseno (3,7,11-trimetildodeca-1,3,6,10-tetraeno)	Feromona de ratón *	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
androsteno (5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona)	Feromona de cerdo **	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
AAPDNRETF	Péptido del MHC	Sintetizado por el centro de péptidos de la Universidad de Colorado
ANPRAFDE	Péptido del MHC	Sintetizado por el centro de péptidos de la Universidad de Colorado

### E. Registros electrofisiológicos.

Para registrar la actividad eléctrica de las neuronas quimiosensoriales aisladas utilicé la técnica de *patch-clamp* en la modalidad *loose-patch* (Reisert y Matthews, 1998), que permite registrar corrientes extracelulares de célula única con baja resistencia de sello ( $\sim 30 \text{ M}\Omega$ ). Esta consiste en succionar el soma, con la aplicación de una leve presión negativa en el interior de la pipeta, dejando expuesta la dendrita y los cilios a los cambios de solución en el baño. Para determinar la concentración de odorantes a nivel de la célula se utilizó la técnica de *whole-cell* (Hamill y cols., 1981). Esta técnica consiste en el

establecimiento de un sello de alta resistencia (5 - 10 G $\Omega$ ) entre la punta de una pipeta de vidrio que contiene el electrodo de registro y la membrana celular, lo que permite registrar corrientes y voltaje en células pequeñas como las neuronas olfatorias. La configuración de *whole-cell* se alcanza al romper la membrana bajo la punta de la pipeta de registro mediante succión. Las pipetas de registros, tanto para *loose-patch* como para *whole-cell* se fabricaron con capilares de vidrio de borosilicato (GlobeScientific Inc., Paramus, NJ) estiradas con un estirador vertical (Narishige, modelo PC-10, Tokio), programado de manera de obtener pipetas con una resistencia de 4 M $\Omega$  (*loose-patch*) y 2 M $\Omega$  (*whole-cell*). La resistencia fue calculada aplicando pulsos de voltaje de 0,2 mV entre los electrodos de registro y la referencia (ambos de Ag/AgCl) y midiendo la magnitud de la corriente. Las pipetas de *loose-patch* fueron llenadas con solución extracelular, mientras que las pipetas de *whole-cell* se llenaron con solución intracelular. El acercamiento de la pipeta de registro a las células seleccionadas por la fluorescencia emitida en el canal verde, se realizó usando un micromanipulador motorizado (Newport Co., Modelo 860-C2, Franklin, MA).

Las corrientes extracelulares y macroscópicas fueron registradas mediante un amplificador de *patch-clamp* (Axopatch 1D, Axon Instruments Inc., Union City, CA), las corrientes fueron filtradas a 1 kHz (*loose-patch*) y 10 kHz (*whole-cell*). Las señales provenientes del amplificador fueron visualizadas directamente en un osciloscopio (ISO-TECH, modelo ISR622, SouthportMerseyside, UK) y digitalizadas mediante una interface análogo-digital (ScientificSolutions Inc., Labmaster, North Chelmsford, MA), y grabadas en el disco duro de un computador PC. La generación de los protocolos de estimulación, la adquisición y análisis de los datos, se realizó usando programa Clampex de pCLAMP 6 (AxonInstrument, Inc.). Las células fueron visualizadas con un microscopio de

fluorescencia invertido (Olympus, modelo IX70, Tokio), con un objetivo Nikon Plan 40x/0.65 Ph2 DL.

La técnica de *loose-patch* no permite controlar el voltaje como en modalidad *whole-cell*, por lo que no se pueden caracterizar debidamente las corrientes iónicas, pero sí permite distinguir cuáles son las NQs que responden a la estimulación con odorantes y presuntas feromonas. Las NQs respondieron luego de 30 minutos desde que se succionó el soma sin que decayera la respuesta.

#### **F. Sistema de estimulación.**

Los odorantes y feromonas fueron aplicados utilizando una pipeta de doble cañón tipo  $\Theta$  (SutterInstrument Co., Novato, CA), hechas con capilares de vidrio de borosilicato (GlobeScientific Inc., Paramus, NJ), y estiradas con un estirador vertical (Narishige, modelo PC-10 Tokio), obteniéndose una punta con un diámetro de  $\sim 2 \mu\text{m}$ .

La solución que contenía los odorantes o feromonas fue eyectada mediante pulsos de presión de nitrógeno (Indura), aplicados con un Picospritzer (construido en el Laboratorio), provisto de una válvula solenoide operada por el computador. Las pipetas de estimulación fueron ubicadas a  $10 \mu\text{m}$  de la célula; la presión del pulso podía fijarse manualmente con un regulador a un valor entre 1-15 libras por pulgada cuadrada (psi), y el comienzo y duración del pulso se establecía con el computador modificando los parámetros del programa de estimulación Clampex (pCLAMP 6). Para todos los registros de *loose-patch* los estímulos fueron aplicados a baja presión (3 psi) y con una duración de 200 ms.

### G. Determinación de la concentración de odorantes a nivel de la célula.

Conociendo la concentración de los odorantes y de las feromonas en el interior de la pipeta de estimulación, la concentración final que alcanza la superficie celular puede estimarse utilizando el método de Firestein y Werblin (1989). Este método permite estimar el factor de dilución ( $F$ ) de la solución eyectada (a una presión dada), al alcanzar la distancia a la que se encuentra la célula. Para determinar  $F$  se utiliza una solución de calibración alta en potasio ( $[K]_{pipeta} = 100 \text{ mM}$ ), la que es aplicada mediante pulsos de presión desde una pipeta de estimulación (igual a las utilizadas en los experimentos), sobre una neurona olfatoria ubicada a una cierta distancia (10, 20, 30  $\mu\text{m}$ ) y mantenida en condiciones de voltaje controlado (-70 mV). El pulso de la solución de calibración aumenta temporalmente la concentración de potasio cerca de la célula, modificando el potencial de equilibrio de ese ion, generándose una corriente de entrada  $i_k$ . Como se muestra a continuación, la medición de  $i_k$  permite estimar la concentración de potasio cerca de la célula ( $[K]_{célula}$ ) y con ello el factor de dilución, para los valores de presión y distancia dados:

$$F = \frac{[K]_{célula}}{[K]_{pipeta}}$$

Para pulsos de duración e intensidad arbitrarios, la corriente de entrada generada es, entonces:

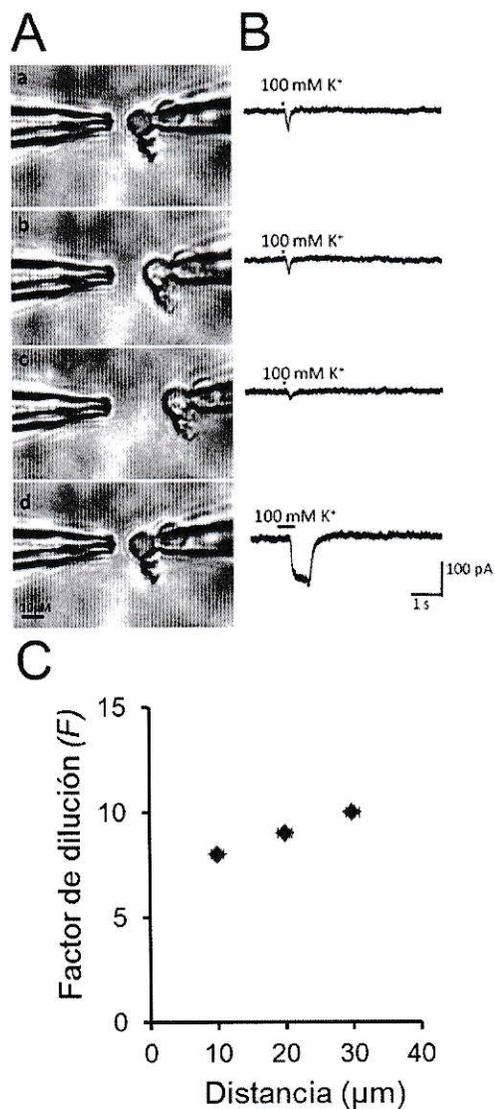
$$i_k = i_{K_{\text{máx}}} \ln \left\{ \frac{[K]_{ext}}{[K]_{pipeta}} \right\} \ln \left\{ \frac{[K]_{célula}}{[K]_{ext}} \right\}$$

Por lo tanto, midiendo la amplitud de esta corriente se puede deducir la concentración de potasio alcanzada a nivel de la célula durante un pulso. Donde  $[K]_{\text{ext}} = 5 \text{ mM}$  y  $[K]_{\text{pipeta}} = 100 \text{ mM}$ . Conociendo  $[K]_{\text{célula}}$  puede calcularse el factor de dilución  $F$ , parámetro que depende de la distancia y la presión. Para calcular el factor de dilución aplique una serie de pulsos de duración fija (200 ms) y desde tres distancias conocidas (10, 20 y 30  $\mu\text{m}$ , *Figura 11*), a una presión fija de 3 psi.

Durante el desarrollo de esta Tesis aplique pulsos de 200 ms a una presión de (3 psi) desde 10  $\mu\text{m}$  de distancia de las células. A partir de los datos recolectados de 3 NQSS se determinó que el factor de dilución desde la pipeta a la célula dada las condiciones experimentales es de  $7.97 \pm 0.7$  veces menor.

#### **H. Inmunocitoquímica.**

Utilicé portaobjetos Shandon Cytospin obtenidos de Thermo Scientific (Rochester, NY), tratados con 1 mg/mL de Concanavalina A y 1 mg/mL de poli-L-lisina hidrobromada para permitir la adhesión de las células (Sigma-Aldrich), y subsecuentemente lavados 3 veces por 10 minutos con buffer fosfato salino (PBS) 10X: 28,75 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , y 75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,2). Las NQSS aisladas fueron colocadas en los portaobjetos y posteriormente fijadas por incubación con 4% de paraformaldehído en PBS por 20 minutos. Luego las células fueron lavadas con PBS 0.1 M, y bloqueadas por dos horas con solución de bloqueo (0.1M PBS, 0.1% tritón X100, 3% suero de burro y 2% albumina de suero bovino). Utilicé el anticuerpo policlonal de cabra contra CNGA2 (Santa Cruz M20 sc13700, Santa Cruz, CA), y el anticuerpo policlonal de conejo contra ANO2 donado por

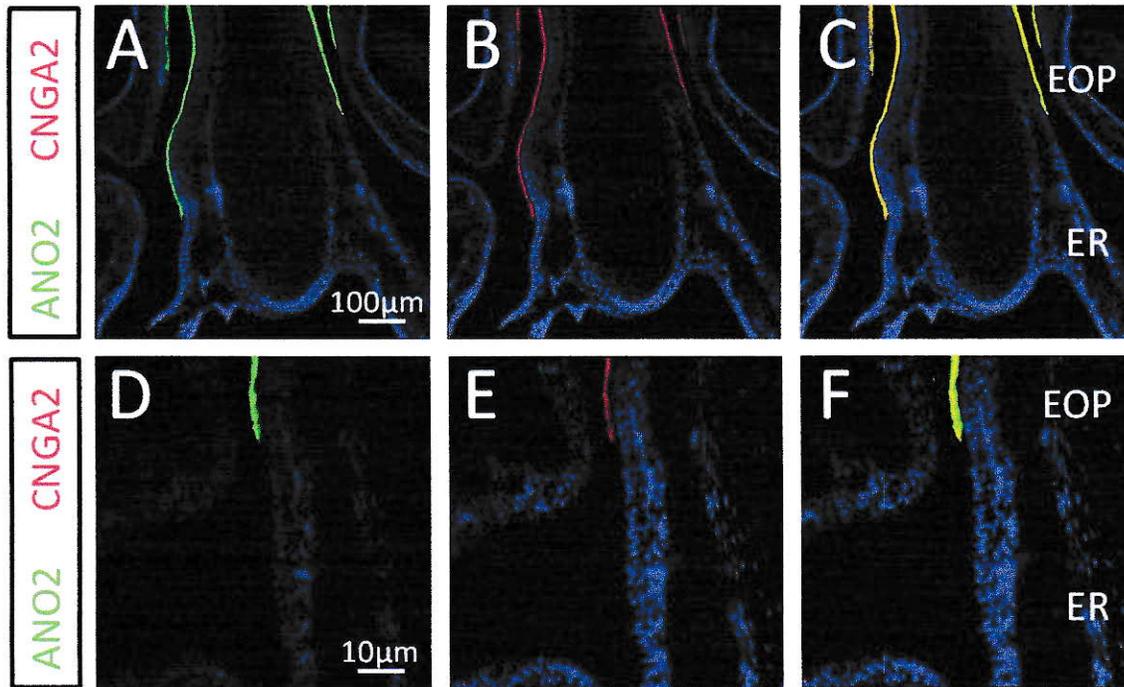


**Figure 11. Medición de la fracción de  $K^+$  en la pipeta que llega a la célula de acuerdo al procedimiento de Firestein, 1989.**

(A) Imagen de una neurona en *whole-cell*, la pipeta de estímulo fue posicionada a 10 μm (a), 20 μm (b), 30 μm (c), 10 μm (d). (B) Respuesta a 100 mM de  $K^+$  de un pulso corto (50 ms) con baja presión (3 psi) (a, b y c), y (d) un pulso largo (500 ms) de 100 mM de  $K^+$  con alta presión (15 psi). (C) Factor de dilución ( $F$ ) en función de la distancia (μm), determinado a partir de las corrientes en B obtenidas a una presión de 3 psi.

Billing y colaboradores (2011). Para la marcación inmunocitoquímica, las NQs aisladas fueron incubadas toda la noche en una habitación de frío con los anticuerpos primarios (1:500 CNGA2 y 1:1000 ANO2). Subsecuentemente, las NQs en el portaobjeto fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario hecho en burro contra conejo para ANO2 (1:400, Alexa 568, Molecular Probes, Grand Island, NY), y con el anticuerpo secundario hecho en burro contra cabra para CNGA2 (1:400, Alexa 568, Invitrogen, Grand Island, NY). Como control, el anticuerpo primario fue removido en los experimentos control, en donde no observé marca. Los anticuerpos tampoco muestran fluorescencia en el epitelio respiratorio (*Figura 12*). Las NQs fueron seleccionadas de diferentes preparaciones.

Las imágenes fueron capturadas en un microscopio confocal Olympus Fluoview de barrido láser (LSCM) FV300 (Olympus Corporation, Tokio), usando un objetivo de aceite de inmersión 60x Olympus PlanApo (apertura numérica de 1.4). Para evitar cualquier problema resultante de la excitación de la banda lateral de los fluorocromos, las imágenes fueron recolectadas secuencialmente con la excitación de una única longitud de onda. Luego se sobrepusieron para producir una imagen compuesta usando el programa Fluoview v5.0 (Olympus Corporation, Tokio). El brillo y el contraste fueron ajustados similarmente en las diferentes imágenes usando Photoshop C6 (Adobe, San José, CA). Las figuras de células aisladas fueron deconvolucionadas usando el programa MATLAB (MathWorks, Natick, MA) con el método de *Richardson-Lucy*, utilizando funciones de dispersión de punto (PSF) determinadas previamente con esferas de 200 nm (Gonzalez-Silva y cols., 2013).



**Figura 12.** Imagen de un corte coronal del epitelio olfatorio que muestra dorsalmente el epitelio olfatorio principal (EOP) y ventralmente el epitelio respiratorio (ER).

Inmunohistoquímica con los anticuerpos contra el canal ANO2 (verde) (A) y (D) y CNGA2 (rojo) (B) y (E) marcan la capa del cilio del epitelio olfatorio (dorsal), pero no la capa del cilio del epitelio respiratorio (ventral). (A), (B) y (C) muestran un menor magnificación de (D), (E) y (F). En azul, los núcleos marcados con DAPI.

## I. Imágenes de Calcio.

Las NQs de ratones TRPM5-GFP fueron disociadas según el protocolo mencionado anteriormente y fijadas a un porta objetos. Las células fueron preincubadas a temperatura ambiente por 30 minutos en una solución extracelular suplementada con 1  $\mu\text{M}$  del indicador de calcio X-rhod-1 AM (acetoximetil éster) y ácido plurónico F-127 20% (Molecular Probes, Cambridge, MA), y luego lavadas varias veces con una solución 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Las NQs aisladas fueron observadas usando un objetivo de inmersión en agua de 60x Olympus LUMPlanFL/IR (0.9 N.A.) en el canal rojo de un microscopio confocal de barrido láser. Se escogieron segmentos de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de cilios para la mediciones de la fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , registrando en el modo de barrido lineal (*linescan*) (Restrepo y cols., 1995), utilizando el *software* propio del microscopio.

La línea de barrido fue posicionada sobre un segmento recto del cilio. El escaneo de este cilio se realizó aproximadamente cada 2 ms durante 1 min, generando una medición en el cambio de la fluorescencia del  $\text{Ca}^{2+}$  en función de tiempo y la distancia. La resolución temporal fue similar (pero no idéntica) en todos los experimentos. Esta dependió del largo del segmento evaluado, siendo más rápido para los segmentos más cortos que para los más largos (rango entre 1.6-2.2 ms). Se midió la fluorescencia en solución normal y en solución baja en  $\text{Ca}^{2+}$ . La estimulación se realizó agregando delicadamente 20  $\mu\text{L}$  de una mezcla de odorantes o de una mezcla de feromonas al baño con una micropipeta. Para evaluar la posibilidad que los eventos transitorios de fluorescencia pudiesen ser artificios, realicé mediciones de fluorescencia usando las mismas condiciones de muestreo en una solución externa que contenía el fluoróforo (en su forma impermeable a la membrana de la célula), a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ ; esto resultó en la emisión de una luz con intensidades en el

mismo rango que las mediciones en una célula. Estas mediciones produjeron una señal uniforme de fluorescencia, completamente carente de un evento transitorio.

**J. Análisis de las mediciones de fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .**

Debido a que el diámetro del cilio disminuye en función de la distancia desde el botón dendrítico, el volumen por unidad del largo disminuye (Menco, 1997). La fluorescencia relativa para X-rhod-1 fue normalizada en función de la distancia dividiendo la intensidad de la fluorescencia por el promedio de la intensidad de fluorescencia en el cilio entero para el periodo que precede a la estimulación. La fluorescencia en función del tiempo (F) fue normalizada por el promedio en el intervalo de 0.5 s inmediatamente anterior al incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la estimulación con odorantes/feromonas, en la distancia en la que el cambio en la fluorescencia fue mayor.

**K. Monitoreo del efecto *Lee Boot* del ciclo estral en ratones.**

Cuando las hembras se encuentran juntas, su ciclo estral se vuelve más lento y en algunos casos se detiene. Este efecto es conocido como el efecto *Lee Boot* (Van der Lee y Boot, 1955). Este efecto fue monitoreado de acuerdo al estudio de Ma y colaboradores (1998), en el cual la fase del ciclo estral fue registrada diariamente con el método convencional de la mucosa vaginal (Rugh, 1990). Para este estudio se escogieron 10 hembras silvestres y 10 hembras *knockout* del canal TRPM5 de entre 2 a 4 meses de edad, que no hubieran estado expuestas a la presencia de un macho. Los animales fueron mantenidos por 21 días en cajas individuales y por 21 días en cajas grupales de 5 hembras

por caja. Los datos fueron analizados usando la prueba de la suma de rangos corregidos por múltiple comparación usando la tasa de falsos descubrimientos (FDR).

#### **L. Estadística.**

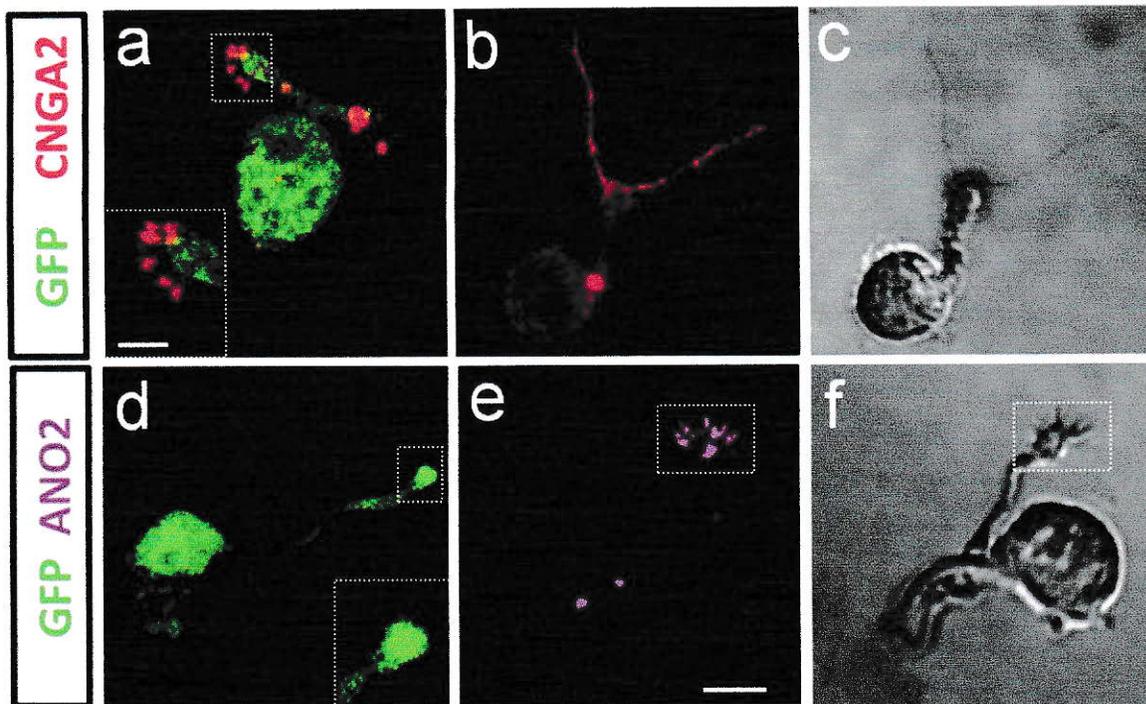
En los experimentos de electrofisiología y de imágenes de calcio usé el test de suma de rankings de Wilcoxon para determinar si existían diferencias significativas (Ding y Wilkins, 2004). Esta prueba no paramétrica fue escogida porque las respuestas no estaban distribuidas normalmente. Utilicé la prueba de  $\chi^2$  para determinar si el número de células que respondían cambiaba significativamente entre los tratamientos. El nivel de significancia utilizado fue de  $P < 0.05$ . Cuando múltiples condiciones fueron comparadas, el valor de  $P$  fue corregido por la tasa de descubrimientos de falsos (FDR) (Curran-Evertt, 2000). Usé Matlab R2012 (Mathworks, Natick, MA) para realizar las pruebas estadísticas. Los errores se expresan como SEM.

## RESULTADOS

### A. Los cilios de las NQs TRPM5<sup>+</sup> expresan el canal CNGA2, pero no el canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> ANO2.

Los experimentos de inmunohistoquímica realizados previamente en cortes de epitelio olfatorio de ratones TRPM5-GFP, que permiten distinguir las NQs TRPM5<sup>+</sup> de las NQs TRPM5<sup>-</sup>, ya que expresan GFP bajo el promotor de TRPM5, sugieren pero no demuestran que los canales TRPM5 y CNGA2 se encuentran coexpresados en los cilios de las NQs (Lin y cols., 2007). Para obtener una mejor resolución de las proteínas localizadas en los cilios tanto de las NQs TRPM5<sup>+</sup> como de las NQs TRPM5<sup>-</sup>, decidí realizar experimentos de inmunocitoquímica en NQs aisladas de ratones TRPM5-GFP.

Los experimentos de inmunocitoquímica muestran la localización del canal CNGA2 (rojo, *Figura 13A*) y la ausencia del canal de cloruro ANO2 (púrpura, *Figura 13D*) en los cilios de las NQs TRPM5<sup>+</sup>. Además muestran la localización del canal CNGA2 (rojo, *Figura 13B*) y del canal de cloruro ANO2 (púrpura, *Figura 13E*) en los cilios de las NQs TRPM5<sup>-</sup>. En las *Figuras 13 C y F* se muestran imágenes de microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) de las NQs mostradas en las *Figuras 13 B y D*, respectivamente. Tomé 10 fotografías de NQs TRPM5<sup>+</sup> y 10 de NQs TRPM5<sup>-</sup>, de diferentes preparaciones; las NQs TRPM5<sup>+</sup> son escasas, correspondiendo aproximadamente al 5% del total de NQs del EOP.



**Figura 13.** Las NQs que expresan GFP indican que expresan TRPM5, también expresan el canal catiónico no selectivo CNGA2, pero no expresan el canal de cloruro ANO2.

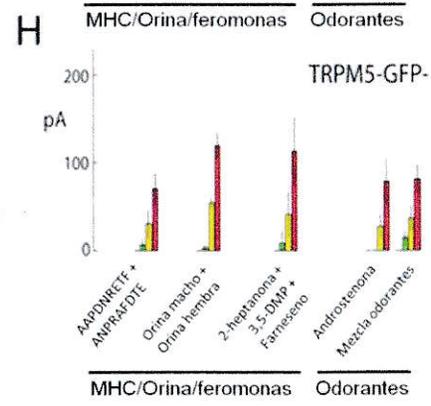
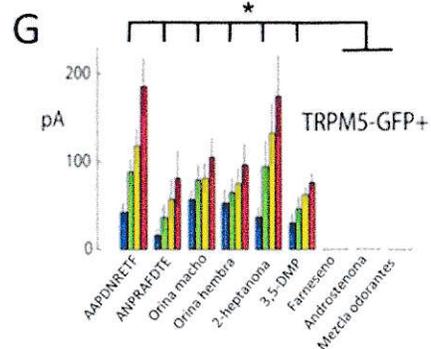
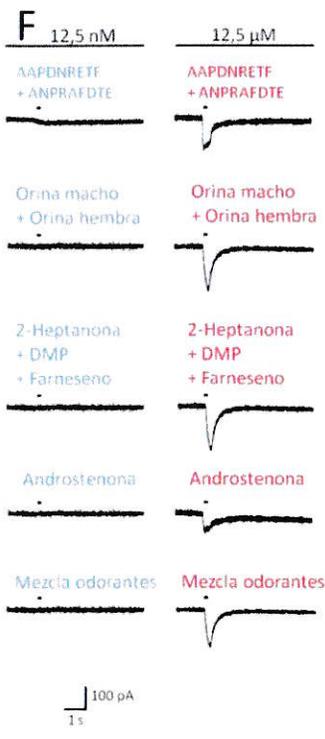
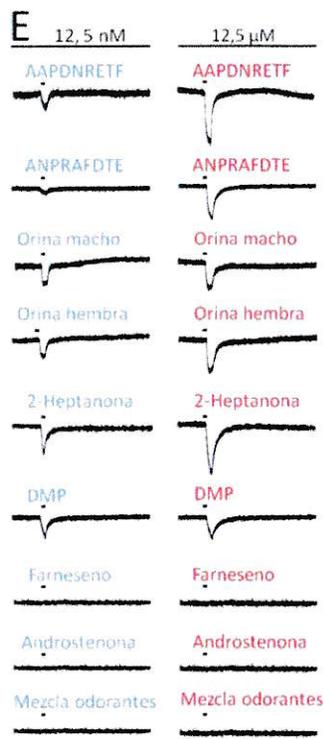
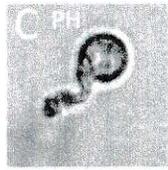
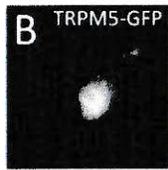
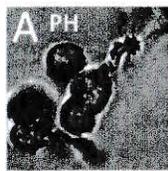
(A y D) Inmunocitoquímica de NQs que expresan GFP (verde), contra el canal CNGA2 (A, rojo) o ANO2 (D, púrpura). (B y E) Inmunocitoquímica de NQs que no expresan GFP, contra el canal CNGA2 (B, rojo) y ANO2 (E, púrpura). (C y F) Micrografías DIC de las NQs en B (C) y en E (F). Los datos representan las imágenes de una NQs GFP<sup>+</sup> y una NQs GFP<sup>-</sup>. Las flechas blancas apuntan al botón dendrítico y a los cilios de las NQs amplificados en los recuadros. La barra de calibración es de 5  $\mu$ m y para el *inset* de 1  $\mu$ m.

Los resultados muestran que todas las NQs expresan CNGA2, pero que existen al menos dos subpoblaciones de NQs, una que expresa el canal TRPM5 y que carece del canal ANO2, y la otra que expresa ANO2 y que carece de TRPM5. Esta observación sugiere la posibilidad que las NQs TRPM5<sup>+</sup> y TRPM5<sup>-</sup> también difieran en su fisiología.

**B. Las NQs TRPM5<sup>+</sup> responden a feromonas, orina y péptidos del MHC, pero no a odorantes.**

Con el objeto de determinar si las NQs TRPM5<sup>+</sup> (*Figuras 14 A y B*) y TRPM5<sup>-</sup> (*Figuras 14 C y D*) corresponden a aquellas que responden a feromonas, realicé registros de corrientes extracelulares en modalidad *loose-patch*, estimulando NQs TRPM5<sup>+</sup> y TRPM5<sup>-</sup> disociadas de ratones TRPM5-GFP con moléculas que clásicamente se han reportado como feromonas específicas de ratón, entre ellas la 2-heptanona, la 2,5-dimetilpirazina (DMP), farneseno, péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, AAPDNRETF y ANPRAFDTE) y orina de ratones hembras y machos C57BL/6 (Leinders-Zufall y cols., 2000; Wang y cols, 2007; Zufall y Leinders-Zufall, 2007). Además, utilicé una mezcla de odorantes (isoamil acetato, cineol, citralva, pino, lial y pimienta negra) y una feromona específica de cerdo (androsteno) (Dorrie y cols., 1995), con el fin de investigar si reconocen feromonas de otra especie.

Las *Figuras 14 E y F* muestran ejemplos representativos de las corrientes registradas en una NQ TRPM5<sup>+</sup> y en una NQs TRPM5<sup>-</sup>, respectivamente, estimuladas a concentraciones bajas (12,5 nM y dilución de la orina 1:80.000) y a concentraciones altas (12,5 µM y 1:80) con cada uno de los compuestos utilizados (tanto feromonas como la



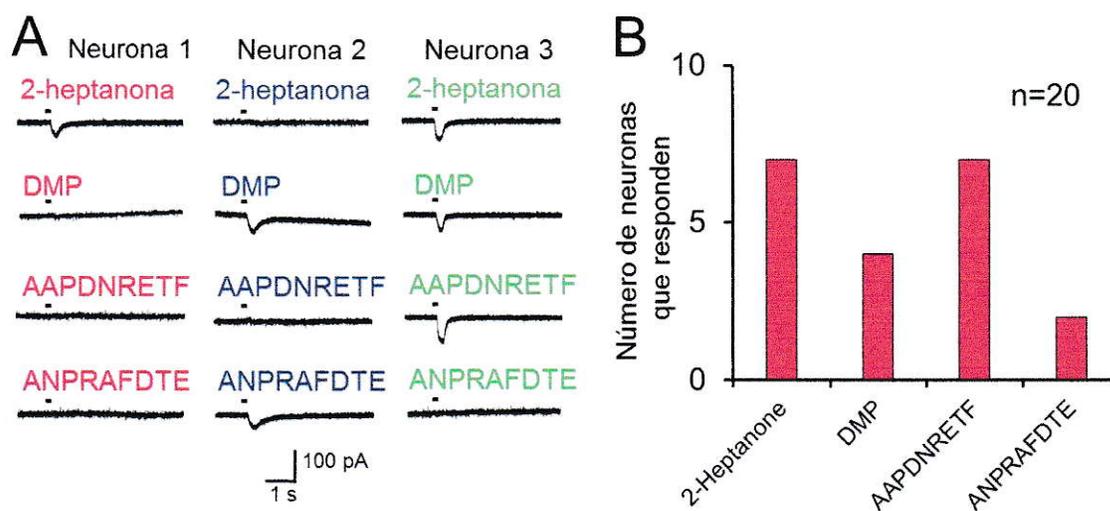
**Figura 14. Las NQSS TRPM5<sup>+</sup> responden a péptidos del MHC, feromonas y orina recolectada de macho y hembra C57BL/6, pero no a odorantes ambientales.**

(A) y (B) Fotografía de NQSS TRPM5<sup>+</sup> bajo contraste de fase (A) y bajo óptica de fluorescencia GFP (B). (C) y (D) Micrografía de NQSS TRPM5<sup>-</sup> bajo contraste de fase (C) y bajo óptica de fluorescencia GFP (D). (E y F) Corrientes *loose-patch* registradas en NQSS TRPM5<sup>+</sup> (E) o TRPM5<sup>-</sup> (F) estimuladas con pulso de 200 ms desde una pipeta de estimulación que contenía una solución con péptidos del MHC, orina de macho y hembra, feromonas u odorantes. (G y H) Promedio de la corriente máxima ( $\pm$ SEM) de la respuesta en NQSS TRPM5<sup>+</sup> o TRPM5<sup>-</sup> (H) inducida por la estimulación a diferentes concentraciones (G). Los asteriscos denotan diferencias significativas en la respuesta usando la prueba de Wilcoxon ranksum  $p < 0,0025$  con el valor  $p$  corregido por la tasa de descubrimientos falsos ( $p < 0,03$ ). La concentración de G y H: 12,5 nM, 125 nM, 1,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, excepto para la orina que fue diluida a 1:80, 1:800, 1:8.000 y 1:80.000. La concentraciones de los odorantes y feromonas y las diluciones de la orina a nivel de los cilios fueron estimadas según el procedimiento descrito por Firestein y Werblin, (1989) (ver métodos). El número de NQSS que responden a cada molécula fue: TRPM5<sup>+</sup>: AAPDNRETF, 5 de 14; ANPRAFDTE, 3 de 30; orina de macho C57BL/6, 7 de 18; orina de hembra C57BL/6, 7 de 18; 2-heptanona, 5 de 18; DMP, 5 de 15; farneseno, 0 de 15; y mezcla de odorantes (isoamil acetato, citralva, lilial, cineol, pino y pimienta negra), 0 de 20. TRPM5<sup>-</sup>: mezcla de los dos péptidos MHC AAPDNRETF y ANPRAFDTE, 6 de 17; mezcla de orina de macho y hembra C57BL/6, 8 de 20; mezcla de 2-heptanona, DMP y farneseno 10 de 26; androstenona, 5 de 20; y mezcla de odorantes, 7 de 17.

mezcla de odorantes). La orina tanto de machos como de hembras, la 2-heptanona, el DMP, y los péptidos del MHC indujeron respuestas a bajas concentraciones en las NQs TRPM5<sup>+</sup>, pero ninguna de ellas respondió a la mezcla de odorantes, a androstenona, y a farneseno. Las NQs TRPM5<sup>-</sup> respondieron a todos los compuestos utilizados y solo a concentraciones altas (12,5  $\mu$ M y 1:80). En las *Figuras 14 G y H* se muestran los promedios de las corrientes máximas evocadas en respuesta a las diferentes concentraciones de feromonas y odorantes de las NQs TRPM5<sup>+</sup> y TRPM5<sup>-</sup> probadas, respectivamente. Estos resultados muestran que las NQs TRPM5<sup>+</sup> eran selectivas a un subconjunto de feromonas, orina, y péptidos del MHC, mientras que las NQs TRPM5<sup>-</sup> podían responder tanto a odorantes como a todas las feromonas probadas. Además, las células TRPM5<sup>+</sup> eran considerablemente más sensibles a estímulos químicos que las NQs que no expresan este canal. Esta es la primera demostración de la presencia de una subpoblación de NQs del EOP ultra sensibles en la detección de feromonas.

### **C. Algunas NQs TRPM5<sup>+</sup> reconocen más de una feromona.**

Como se mostró anteriormente, las NQs TRPM5<sup>+</sup> responden de manera selectiva a distintas feromonas (*Figura 14E*). Sin embargo, el 28% de las NQs TRPM5<sup>+</sup> responden a 2-heptanona, el 33% a DMP, el 36% al péptido AAPDNRETF y el 10% al péptido ANPRAFDTE. Esto sugiere que algunas de las NQs TRPM5<sup>+</sup> responden a más de alguna de las feromonas probadas. Con el fin de investigar esto, realicé registros de corrientes en una NQ TRPM5<sup>+</sup> estimulada con las 4 feromonas mencionadas, de manera separada. La *Figura 15A* muestra ejemplos representativos de las corrientes registradas en una NQ TRPM5<sup>+</sup>. Se observó que algunas neuronas responden a una única feromona, otras



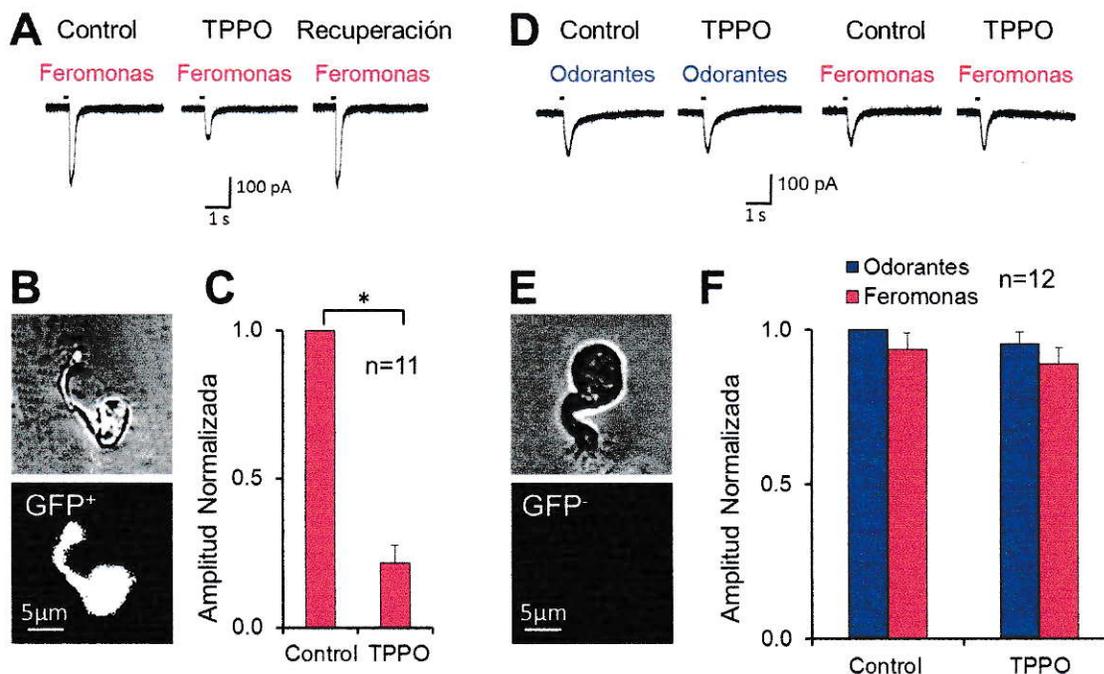
**Figura 15. Resultados de experimentos de *loose-patch* donde NQs TRPM5<sup>+</sup> fueron estimuladas con 12,5 nM de 2-heptanona, DMP y dos péptidos del MHC.**

Como se muestra en (A) algunas NQs responden a única molécula, mientras otras responden a diversos estímulos, (B) muestra el número de neuronas que respondieron a cada uno de estos estímulos. De 20 NQs, 10 no respondieron a ninguno de los estímulos, 3 respondieron a uno, 3 respondieron a dos y 4 respondieron a 3 estímulos.

responden a dos feromonas y otras incluso responden a tres feromonas, confirmando que algunas NQs TRPM5<sup>+</sup> responden a más de una feromona. El número de neuronas que responden a cada uno de estos estímulos se muestran en la *Figura 15B*. Además, el 50% de las NQs TRPM5<sup>+</sup> no respondieron a ninguno de los estímulos probados, sugiriendo que estas NQs podrían responder a otras feromonas u a otros odorantes.

**D. Los experimentos farmacológicos indican que el canal TRPM5 media la respuesta a feromonas en las NQs TRPM5<sup>+</sup>.**

Si TRPM5 está implicado en la transducción de feromonas (Lin et al., 2007), el bloqueo de este canal debería suprimir las respuestas de *loose-patch* a feromonas en las NQs TRPM5<sup>+</sup> pero no en las que carecen de este canal. Para corroborar esto, examiné el efecto del bloqueador selectivo del canal TRPM5 TPPO (150  $\mu$ M; IC<sub>50</sub> = 30  $\mu$ M; Liu y cols., 2011; Palmer y cols., 2010) sobre las corrientes evocadas por las feromonas. En las *Figuras 16 A y D* se muestran ejemplos representativos de las corrientes registradas en una NQ TRPM5<sup>+</sup> (*Figura 16B*) y en una NQ TRPM5<sup>-</sup> (*Figura 16E*), respectivamente, estimuladas con una mezcla de feromonas en presencia de TPPO. Las NQs TRPM5<sup>-</sup> también fueron estimuladas con una mezcla de odorantes, en presencia y ausencia de TPPO. Se observó que TPPO suprimió parcialmente la respuesta en las NQs TRPM5<sup>+</sup> y que su efecto es reversible después del lavado. En promedio, TPPO redujo la respuesta en 75%  $\pm$  15 (*Figura 16C*; n=11), mientras que TPPO no bloqueó la respuesta a la mezcla de feromonas ni a la mezcla de odorantes en las NQs TRPM5<sup>-</sup>. La respuesta a odorantes y feromonas de las NQs TRPM5<sup>-</sup> en presencia o ausencia de TPPO no presenta diferencias



**Figura 16. El bloqueador del canal TRPM5 (TPPO) inhibe reversiblemente las respuestas a feromonas en NQs TRPM5<sup>+</sup>, pero no en las NQs TRPM5<sup>-</sup>.**

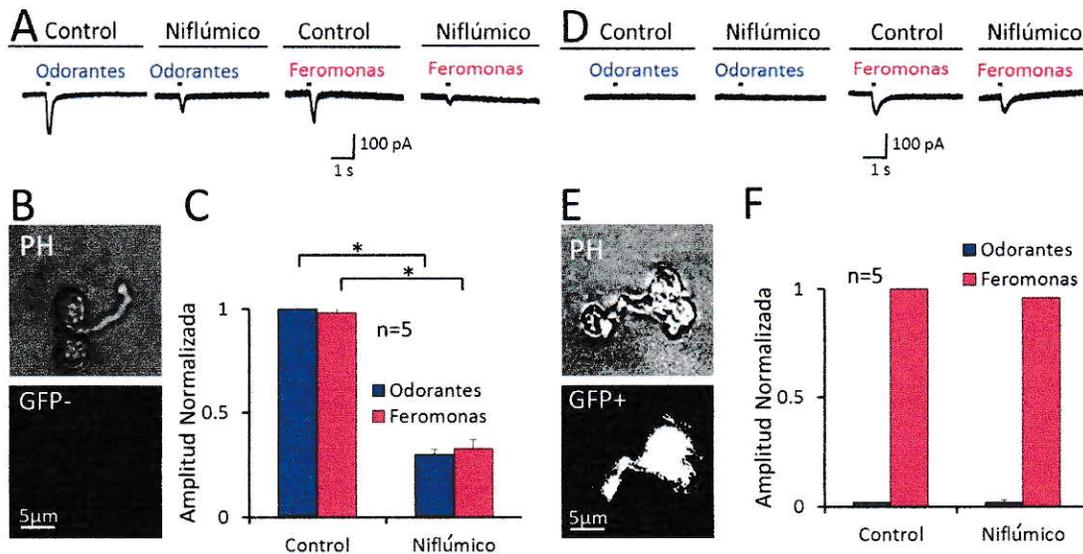
(A-C) NQs GFP<sup>+</sup> en ausencia y presencia de TPPO. (A) Ejemplo de una corriente de *loose-patch* en ausencia y presencia del inhibidor del TRPM5 (TPPO), y la recuperación de la respuesta. (B) Imagen de una NQ GFP<sup>+</sup> (arriba: Nomarski, abajo: fluorescencia). (C) Corriente máxima de la respuesta a feromonas normalizada con respecto al control. Se observan diferencias significativas entre la estimulación con feromonas en ausencia y presencia de TPPO (prueba de Wilcoxon ranksum  $p < 0,0001$ ,  $n = 11$ ). (D-F) NQs GFP<sup>-</sup> en ausencia y presencia de TPPO. (D) Ejemplo de una corriente de *loose-patch* en ausencia y presencia del inhibidor del TRPM5 (TPPO), y la recuperación de la respuesta tras lavado de TPPO. (E) Imagen de una NQ GFP<sup>-</sup> (Arriba: Nomarski, abajo: GFP). (F) Corriente máxima de la respuesta a feromonas y odorantes normalizadas a la respuesta a feromonas en ausencia de TPPO. No hubo diferencias significativas entre la estimulación con feromonas y odorantes en ausencia y presencia de TPPO (test de Wilcoxon ranksum  $p > 0,05$ ,  $pFDR = 0,025$ ,  $n = 12$ ). Barras de error representan SEM.

significativas (*Figura 16F*). Esta observación apoya la idea que el canal TRPM5 solo participa en la respuesta en las NQSs TRPM5<sup>+</sup>.

Con el fin de corroborar que el canal de Cl<sup>-</sup> ANO2 se encuentra involucrado en las respuestas a feromonas y odorantes de las NQSs TRPM5<sup>-</sup> (*Figura 14F*), pero no en las respuestas a feromonas de las NQSs TRPM5<sup>+</sup> (*Figura 14E*), utilicé un inhibidor de canales de Cl<sup>-</sup> (ácido niflúmico 20 μM; IC<sub>50</sub> = 35.8 μM; Dai y Zhang, 200) sobre las corrientes evocadas por las feromonas y odorantes. Las *Figuras 17 A y D* muestran ejemplos representativos de las corrientes registradas en una NQS TRPM5<sup>-</sup> (*Figura 17B*) y en una NQS TRPM5<sup>+</sup> (*Figura 17E*), respectivamente, estimuladas con una mezcla de feromonas y con una mezcla de odorantes en presencia y ausencia de ácido niflúmico. Se observó que el ácido niflúmico inhibió parcialmente la respuesta en las NQSs TRPM5<sup>-</sup> y que su efecto es reversible después del lavado. En promedio, el ácido niflúmico redujo la respuesta en 72% ± 19 (*Figura 17C*; n=5), mientras que el ácido niflúmico no afectó significativamente la respuesta a feromonas en las NQSs TRPM5<sup>+</sup> (*Figura 17F*). Este resultado apoya la idea que el canal de Cl<sup>-</sup> ANO2 no participa en la respuesta a feromonas en las NQSs TRPM5<sup>+</sup>, pero sí participa en la respuesta a feromonas y odorantes en las NQSs TRPM5<sup>-</sup>.

#### **E. La activación de TRPM5 está acoplada a la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través del canal CNG.**

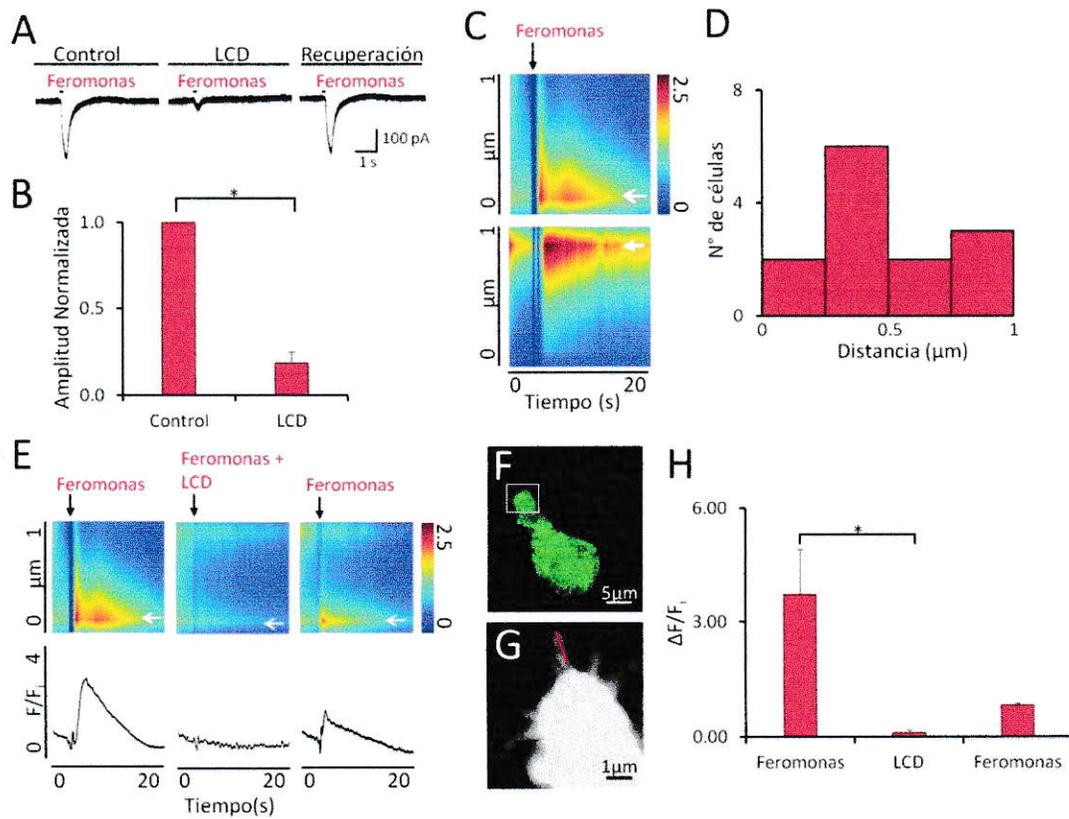
Como se muestra en la *Figura 13*, el canal activado por Ca<sup>2+</sup> TRPM5 y el canal de Ca<sup>2+</sup> CNGA2 son coexpresados en los cilios olfatorios de las NQSs TRPM5<sup>+</sup>. La colocalización de ambos canales permite suponer que el Ca<sup>2+</sup> que activa al TRPM5 ingresa al cilio por el canal CNGA2 que es el único canal que deja pasar Ca<sup>2+</sup> en el cilio. Por esto,



**Figura 17. Bloqueo de ANO2 con ácido niflúmico suprime la respuesta a odorantes y feromonas en NQs TRPM5<sup>-</sup>, pero no la respuesta a feromonas en NQs TRPM5<sup>+</sup>.**

(A) Respuesta a odorantes y feromonas en NQs TRPM5<sup>-</sup> en presencia y ausencia de ácido niflúmico (300  $\mu$ M). (B) Células de A vistas con óptica de contraste de fase y con fluorescencia GFP. (C) Respuesta máxima a feromonas y odorantes en NQs TRPM5<sup>-</sup> normalizadas a la respuesta a odorantes en ausencia de ácido niflúmico (Wilcoxon ranksum  $p < 0,015$ ,  $p\text{FDR} = 0,05$ ,  $n = 5$ ). (D) Respuesta a odorantes y feromonas en NQs TRPM5<sup>+</sup> en presencia y ausencia de ácido niflúmico. (E) Células de D vistas con contraste de fase y con fluorescencia GFP. (F) Respuesta máxima a feromonas y odorantes en NQs TRPM5<sup>+</sup> normalizadas a la respuesta de feromonas en la ausencia de ácido niflúmico (Wilcoxon ranksum  $p < 0,0001$ ,  $n = 5$ ). Barras de error son SEM.

es esperable que la inhibición del canal CNGA2 con *L-cis*-diltiazem ( $IC_{50} = 154 \mu\text{M}$ , Xu y cols., 1999) suprima la respuesta a feromonas mediada por TRPM5. La *Figura 18A* muestra un ejemplo representativo de la corriente registrada en presencia de *L-cis*-diltiazem, donde se observó que el inhibidor redujo la corriente evocada en respuesta a feromonas de forma reversible. En promedio, *L-cis*-diltiazem suprimió la respuesta a feromonas en  $86\% \pm 8$  (*Figura 18B*,  $n = 5$ ), sugiriendo que CNG está implicado en la respuesta a feromonas mediada por TRPM5. El resultado anterior sugiere además que ocurren incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del cilio de las NQSs TRPM5<sup>+</sup> mediados por el canal CNG. Para demostrar esta hipótesis, estudié si ocurrían en los cilios cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por feromonas en presencia y ausencia de *L-cis*-diltiazem con la técnica de imágenes de calcio en un confocal en modo de barrido en línea. La *Figura 18C* muestra un ejemplo representativo de los incrementos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  altamente localizados a lo largo del cilio de diferentes NQSs en respuesta a la estimulación con feromonas (medición del incremento de la fluorescencia usando el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  X-rhod-1). La *Figura 18D* muestra la distribución de los puntos en que aumento el  $\text{Ca}^{2+}$  en los cilios de las células estudiadas. En la parte superior de la *Figura 18E* se muestra una representación en pseudocolor de la fluorescencia de X-rhod-1, que expresa la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en un cilio, mientras que en la parte inferior se muestra la fluorescencia relativa medida en el punto indicado por la flecha blanca. La fluorescencia fue normalizada con respecto a la distancia en el segmento del cilio (ordenada) y tiempo (abscisa), métodos. Se aplicó *L-cis*-diltiazem y se observó que los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por feromonas se redujeron en  $\sim 79\% \pm 9$  (*Figura 18 H*,  $n=5$ ). La *Figura 18F* muestra la imagen de la NQS TRPM5<sup>+</sup> en la cual realicé el registro y



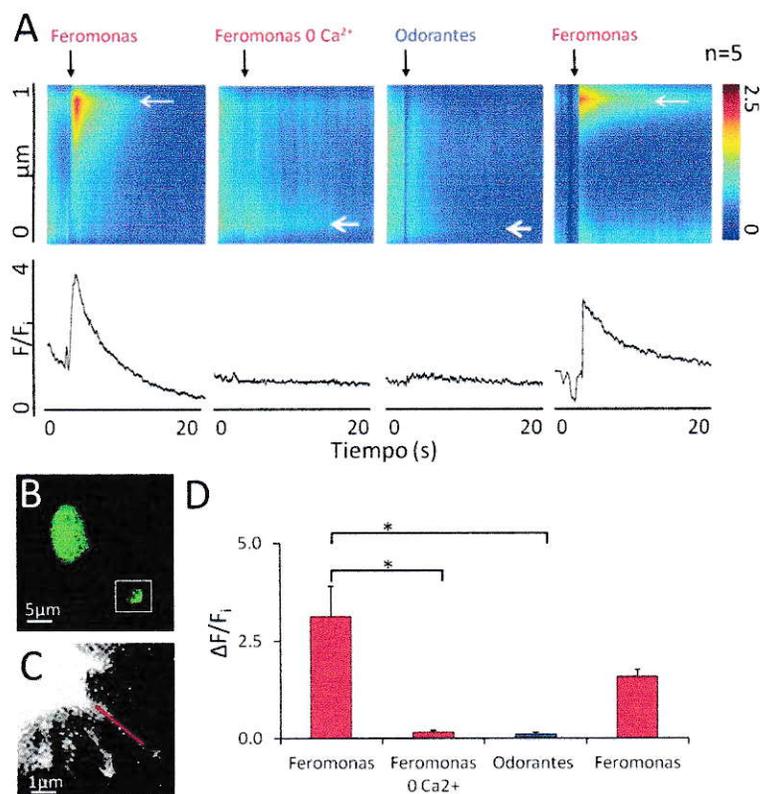
**Figura 18. La inhibición de CNGA2 con L-cis-diltiazem es consistente con la apertura del canal permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  CNG después de la estimulación con feromonas en las NQSs GFP<sup>+</sup>.**

(A) Registros de las corrientes en respuesta a feromonas medidas con *loose-patch* en NQSs GFP<sup>+</sup>, en ausencia y presencia del inhibidor del CNG L-cis-diltiazem (20  $\mu\text{M}$ ). (B) Respuesta máxima a feromonas normalizada a la respuesta a feromonas en ausencia de L-cis-diltiazem. Hubo diferencias significativas entre la estimulación con feromonas y feromonas en presencia de L-cis-diltiazem (test de Wilcoxon ranksum  $p < 0,015$ , pFDR = 0,05,  $n = 4$ ). Barras de error representan SEM. (C) Dos ejemplos de incrementos discretos de  $\text{Ca}^{2+}$  ciliar inducidos por feromonas medidos a lo largo del primer micrómetro. Representación en pseudocolor del  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de la fluorescencia de X-rhod-1 normalizado en función de la distancia en el segmento del cilio (ordenada) y del tiempo (abscisa) (la fluorescencia fue normalizada a la fluorescencia durante los 0,5 s antes de la adición de la feromona). (D) Registro de incrementos discretos inducidos por feromonas en el  $\text{Ca}^{2+}$  intraciliar en 13 experimentos diferentes muestran que los incrementos discretos de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron localizado en todo el largo del cilio (medidos en el primer  $\mu\text{m}$  del botón dendrítico). (E) Arriba: representación en pseudocolor del  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de la fluorescencia de X-rhod-1 normalizado en función a la distancia en el segmento del cilio (ordenada) y tiempo (abscisa). Código de color de la intensidad de fluorescencia relativa, de acuerdo con la barra de pseudocolor. Flecha blanca: tiempo de la estimulación con feromonas en presencia y ausencia de L-cis-diltiazem. Abajo:  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de la fluorescencia de X-rhod-1 normalizado en el lugar del máximo cambio en la fluorescencia en el segmento del cilio. (F y G) GFP (F), fluorescencia del botón dendrítico y de los cilios de una NQS GFP<sup>+</sup> cargada con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  X-rhod-1 (G). La línea roja denota donde realicé el *linescan* del cilio para la colección de la fluorescencia respecto al tiempo. (H) Gráfico de barras muestra que las NQSs GFP<sup>+</sup> son inhibidas por L-cis-diltiazem cuando son estimuladas con feromonas. Asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control (respuesta a feromonas) (test de Wilcoxon ranksum test  $p < 0,02$ , pFDR = 0,05,  $n = 5$ ).

la *Figura 18G* muestra la fluorescencia del botón dendrítico y de los cilios de la misma NQS. La línea roja en la micrografía de la *Figura 18G* muestra el lugar del cilio donde realicé el barrido en línea con el microscopio confocal. Estos resultados muestran que el  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa por el canal CNG es fundamental en la respuesta de las NQs  $\text{TRPM5}^+$  a feromonas.

**F. El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que ingresa por el canal CNGA2 es responsable de la activación del canal TRPM5.**

Si la activación del canal TRPM5 es dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal CNGA2 en los cilios, no debieran observarse incrementos en la fluorescencia del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por la estimulación con feromonas. En la parte superior de la *Figura 19A* se muestra un ejemplo representativo de la fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el cilio de una NQS  $\text{TRPM5}^+$  y en la parte inferior se muestra la fluorescencia relativa medida en el punto indicado por la flecha blanca. Se observó que la NQS  $\text{TRPM5}^+$  respondió a feromonas, pero no a odorantes, y la respuesta a feromonas fue suprimida al remover el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (*Figura 19D*,  $n=8$ ). La *Figura 19B* muestra la imagen de la NQS  $\text{TRPM5}^+$  en la cual realicé el registro y la *Figura 19C* muestra la fluorescencia del botón dendrítico y de los cilios de la misma NQS. Mis resultados corroboran que el calcio que activa al canal TRPM5 proviene del medio extracelular. Además, muestran que ninguna de las NQs  $\text{TRPM5}^+$  respondió a la estimulación con odorantes, en concordancia con los registros de *loose-patch*, reafirmando la selectividad de esta subpoblación de NQs por las feromonas.

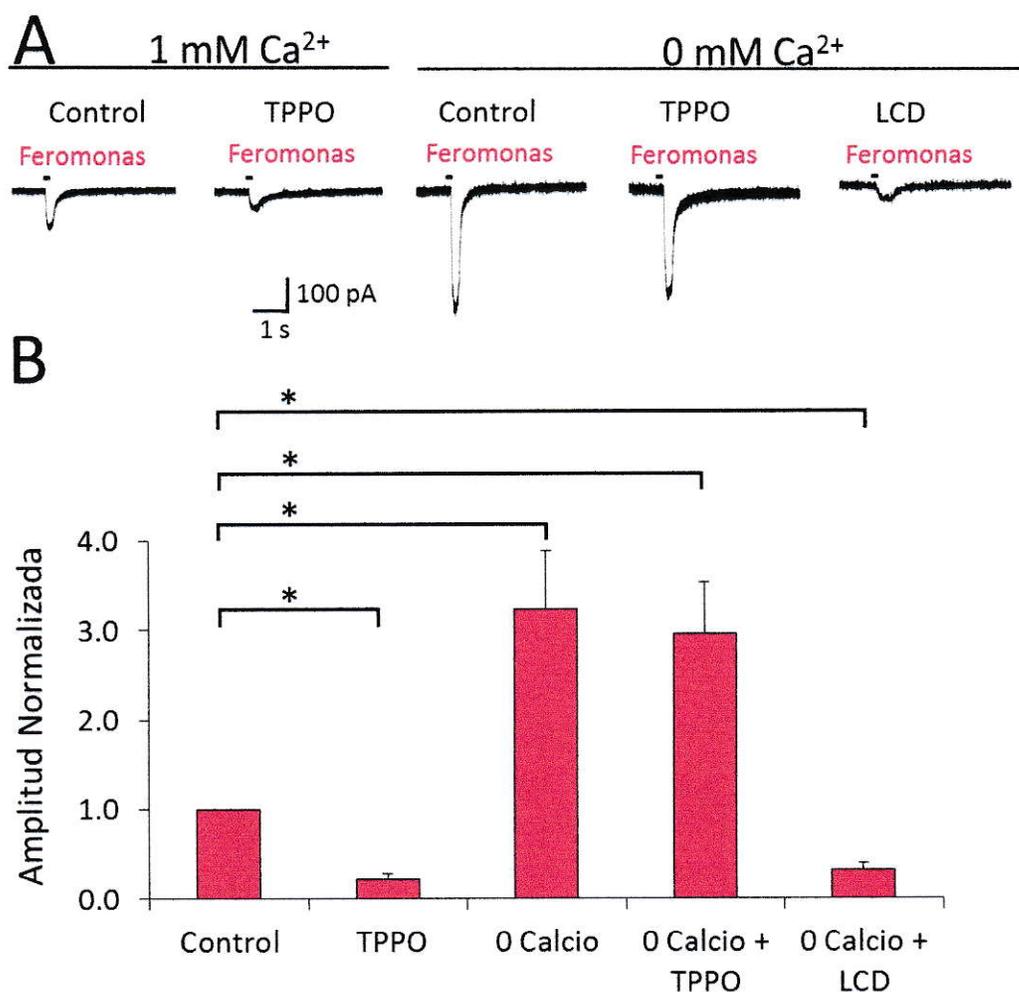


**Figura 19. El canal TRPM5 del cilio de las NQs TRPM5<sup>+</sup> es posiblemente activado por Ca<sup>2+</sup> extracelular.**

(A) Arriba: representación en pseudocolor de la fluorescencia de X-rhod-1 en función de la concentración de Ca<sup>2+</sup> normalizado con respecto a la distancia en el segmento del cilio (ordenada) y del tiempo (abscisa). Código de color de la intensidad de fluorescencia relativa, de acuerdo con la barra de pseudocolor. Abajo: Ca<sup>2+</sup> dependiente de la fluorescencia de X-rhod-1 normalizado al lugar del máximo cambio en la fluorescencia del segmento del cilio. (B) NQs TRPM5<sup>+</sup>. (C) Fluorescencia del botón dendrítico y de los cilios de una NQs GFP<sup>+</sup> cargada con el indicador de Ca<sup>2+</sup> X-rhod-1. (D) Gráfico de barras muestra que las NQs GFP<sup>+</sup> responden a feromonas, pero no a odorantes, y que la respuesta a feromonas es inhibida por la remoción del Ca<sup>2+</sup> extracelular. Asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas compradas con el control (primera respuesta a feromonas) (test de Wilcoxon ranksum test  $p < 0,0001$ ,  $pFDR = 0,03$ ,  $n=8$ ). Barras de error representan SEM.

**G. La corriente a través de CNGA2 aumenta en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.**

Como se mostró anteriormente, el bloqueo con TPPO en las NQSs TRPM5<sup>+</sup> redujo la corriente en ~80%, permaneciendo una corriente de menor tamaño (*Figura 16*); además se mostró que el  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa por el canal CNGA2 es el responsable de la activación del canal TRPM5 (*Figura 19*). Esto plantea la pregunta si es que el remanente de la corriente que queda luego del bloqueo con TPPO en las NQSs TRPM5<sup>+</sup> es una corriente generada por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  por el canal CNGA2. Para investigar esto, primero realicé registros de corrientes en una NQS TRPM5<sup>+</sup> estimulada con feromonas en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular con y sin TPPO. A la izquierda de la *Figura 20A* se muestra un ejemplo representativo de las corrientes registradas. Se observó que la estimulación con feromonas produce corrientes que pueden ser bloqueadas parcialmente con TPPO (150  $\mu\text{M}$ ), como se mostró anteriormente. Luego registré en esta misma NQS en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, siendo esperable que en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular no ocurrieran corrientes evocadas por feromonas. Al centro de la *Figura 20A* se muestran las corrientes registradas. Inesperadamente, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se generaron corrientes de mayor tamaño que en condiciones control. Para investigar si estas corrientes corresponden a la entrada de iones por el canal TRPM5 o por el canal CNGA2, registré esta misma NQS en presencia de TPPO (150  $\mu\text{M}$ ) y luego de *L-cis*-diltiazem (20  $\mu\text{M}$ ). A la derecha de la *Figura 20A* se muestran la corriente era insensible al TPPO pero sí se bloqueó parcialmente con *L-cis*-diltiazem. La *Figura 20B*, muestra las corrientes máximas en respuesta a feromonas para los diferentes tratamientos en A, se observaron diferencias significativas, indicando que CNGA2 participa en la respuesta a feromonas en NQSs TRPM5<sup>+</sup>.



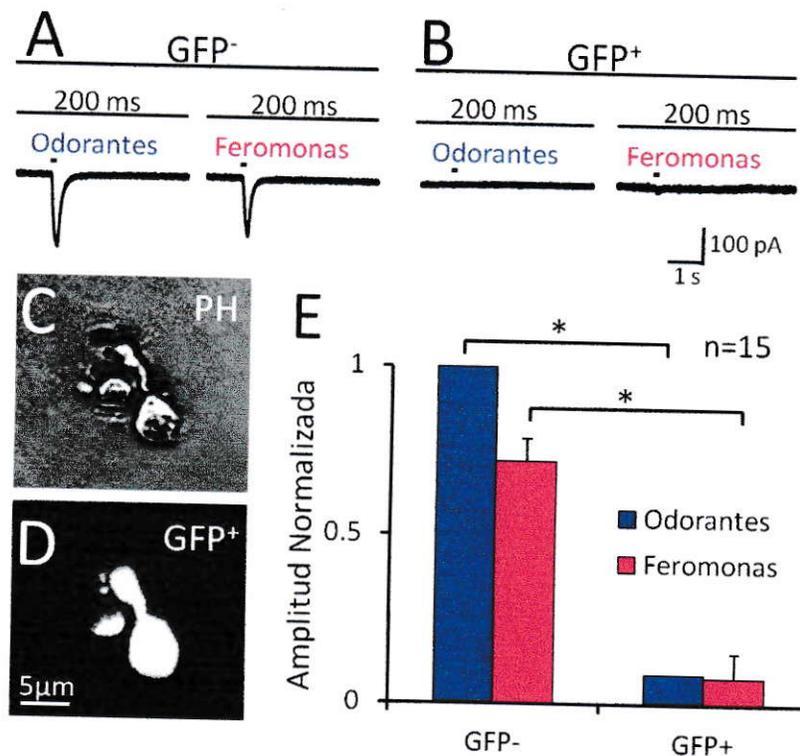
**Figura 20. CNGA2 participa en la respuesta a feromonas en NQs TRPM5<sup>+</sup>.**

(A) Ejemplos de los registros de *loose-patch* como respuesta a feromonas en NQs TRPM5<sup>+</sup>. Los dos trazos a la izquierda son corrientes en presencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular, en la ausencia y presencia de TPPO. Los tres trazos de la derecha son corrientes en la ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular, con y sin TPPO y con *L-cis*-diltiazem. (B) Corriente máxima en respuesta a feromonas para los diferentes tratamientos en A, normalizadas a la respuesta a feromonas en presencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular sin TPPO. Asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas comparadas al control (prueba de Wilcoxon p<0,015, pFDR= 0,05, n=11). Barras de error representan SEM.

#### H. NQSS del ratón *knockout* para TRPM5 no responden a feromonas.

Como muestran los experimentos farmacológicos presentados anteriormente en NQSS TRPM5<sup>+</sup>, el bloqueo con TPPO del canal TRPM5 afecta la respuesta a feromonas (*Figura 16*), implicando a este canal en la vía de transducción. Para estudiar con otro enfoque la participación de TRPM5 en la respuesta a feromona, se generó un ratón TRPM5-KO-GFP de la cruce del ratón TRPM5 *knockout* (TRPM5-KO<sup>-/-</sup>) con el ratón transgénico que expresa GFP bajo el promotor de TRPM5, resultando un ratón que carece del TRPM5 y que expresa GFP en las células que expresarían TRPM5 si no carecieran del gen de este canal (TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup>). Los primeros ratones que se obtuvieron eran heterocigotos; estos se volvieron a cruzar entre ellos hasta obtener un ratón *knockout* homocigoto de TRPM5 y que expresara GFP bajo el promotor de TRPM5.

Realicé registros de corrientes en NQSS TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup> y TRPM5-KO-GFP<sup>-</sup> aisladas de ratones TRPM5-KO-GFP. Las *Figuras 21 A y B* muestran ejemplos representativos de las corrientes registradas en una NQSS TRPM5-KO-GFP<sup>-</sup> y en una NQSS TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup> (*Figuras 21 C y D*), respectivamente. Se observó que las NQSS TRPM5-KO-GFP<sup>-</sup> responden tanto a odorantes como a feromonas, mientras que las NQSS TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup> no responden a ninguna de las dos mezclas (*Figura 21E, n=15*). Este resultado refuerza la evidencia que el canal TRPM5 es fundamental para que las células especializadas respondan a feromonas. Además, es consistente con los experimentos en NQSS aisladas del ratón TRPM5-GFP (*Figura 14*), las NQSS TRPM5<sup>-</sup> responden a odorantes y feromonas, mientras que las NQSS TRPM5<sup>+</sup> responde de manera selectiva a feromonas.



**Figura 21. TRPM5 knockout sustancialmente disminuye la respuesta de loose-patch de las NQs que expresan GFP en ratones TRPM5-KO-GFP.**

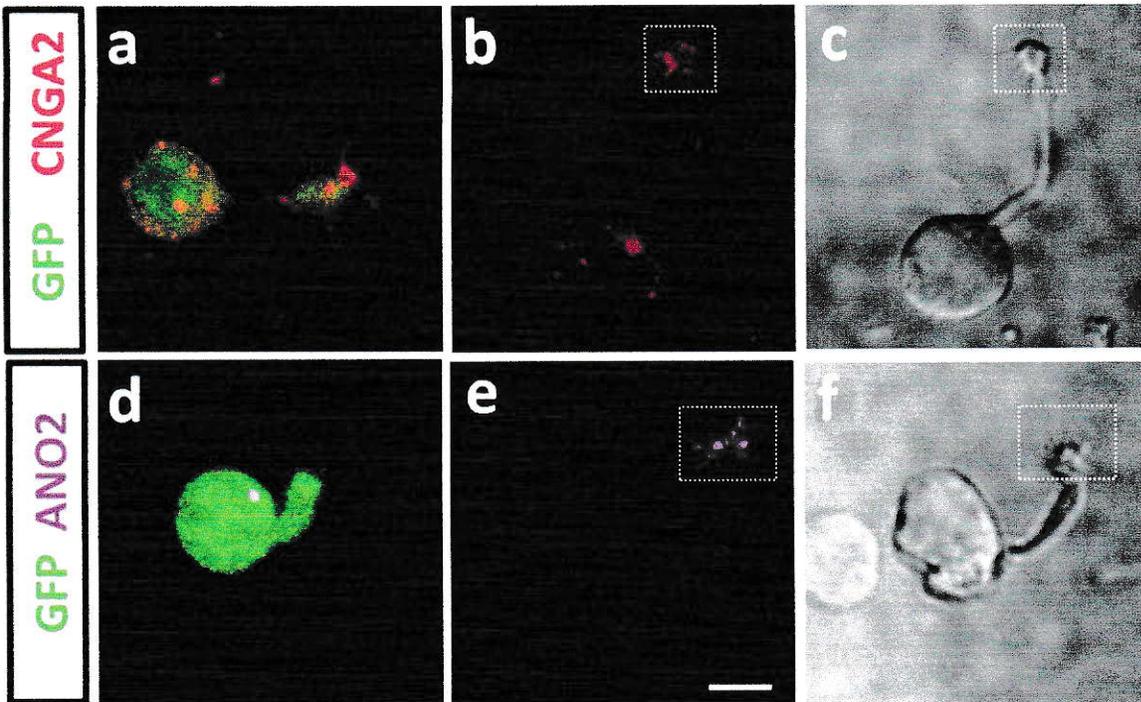
(A y B) Ejemplo de una respuesta de loose-patch a feromonas en NQs TRPM5<sup>-</sup> (A) y TRPM5<sup>+</sup> (B). (C y D) Imagen de una NQs TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup> tomada con contraste de fase (C) y con óptica de fluorescencia para GFP (D). (E) Gráfico de barras muestra la cuantificación de la respuesta de loose-patch a feromonas y odorantes en NQs TRPM5-KO-GFP<sup>-</sup> y TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup>. Asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas (prueba de Wilcoxon  $p < 0,0001$ ,  $pFDR = 0,03$ ,  $n=10$ ). Barras de error representan SEM.

### **I. El ratón *knockout* de TRPM5 expresa CNGA2 y no el canal de cloruro ANO2.**

Para corroborar que el ratón *knockout* de TRPM5 expresa el canal CNGA2 y pero no el canal ANO2 en los cilios de las NQSS TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup>, y que las neuronas TRPM5-KO-GFP<sup>-</sup> expresan el canal CNGA2 y el canal ANO2 en los cilios, como se había mostrado anteriormente en el ratón TRPM5-GFP (*Figura 13*), decidí realizar experimentos de inmunocitoquímica de las NQSS TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup> y TRPM5-KO-GFP<sup>-</sup> asiladas del ratón TRPM5-KO-GFP. Se observó la localización del canal CNGA2 (rojo, *Figura 22A*) y la ausencia del canal de cloruro ANO2 (púrpura, *Figura 22D*) en los cilios de las NQSS TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup>. Además, muestran la localización del canal CNGA2 (rojo, *Figura 22B*) y del canal de cloruro ANO2 (púrpura, *Figura 22E*) en los cilios de las NQSS TRPM5-KO-GFP<sup>-</sup>. En las *Figuras 22 C y F* se muestran imágenes de microscopía DIC de las NQSS mostradas en las *Figuras 22 B y D*, respectivamente. Tome fotografías de 10 NQSS TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup> y de 10 TRPM5-KO-GFP<sup>-</sup>, seleccionadas de diferentes preparaciones.

### **J. Los ratones *knockout* del canal TRPM5 no presentan el efecto *Lee-Boot*.**

Un estudio realizado en hembras de ratones silvestres a las cuales se les monitoreó cuánto demoraban en completar su ciclo estral, mostró que en presencia de 3,5-dimetilpirazina (DMP), una de las feromonas utilizadas en este trabajo que provocan respuestas en NQSS TRPM5<sup>+</sup> (*Figura 14*), presentaron una supresión o prolongación de su ciclo estral (efecto *Lee-Boot*) (Ma, 1998). El efecto *Lee-Boot* también se observa cuando



**Figura 22.** NQs aisladas del ratón TRPM5-KO-GFP<sup>+</sup> expresan CNGA2, pero no ANO2.

(A y D) Imagen de una NQS TRPM5-GFP<sup>+</sup> (verde) aislada del ratón TRPM5-KO-GFP incubadas con el anticuerpo contra CNGA2 (A, rojo) y ANO2 (D, púrpura). (B y E) Imagen de una NQS que no expresa GFP aisladas del ratón TRPM5-KO-GFP inmunoreaccionada con el anticuerpo contra CNGA2 (B, rojo) y ANO2 (E, purpura). NQs TRPM5-GFP<sup>-</sup> fueron localizadas con microscopia de luz usando la óptica DIC (C y F). La barra de calibración es de 5  $\mu$ m.

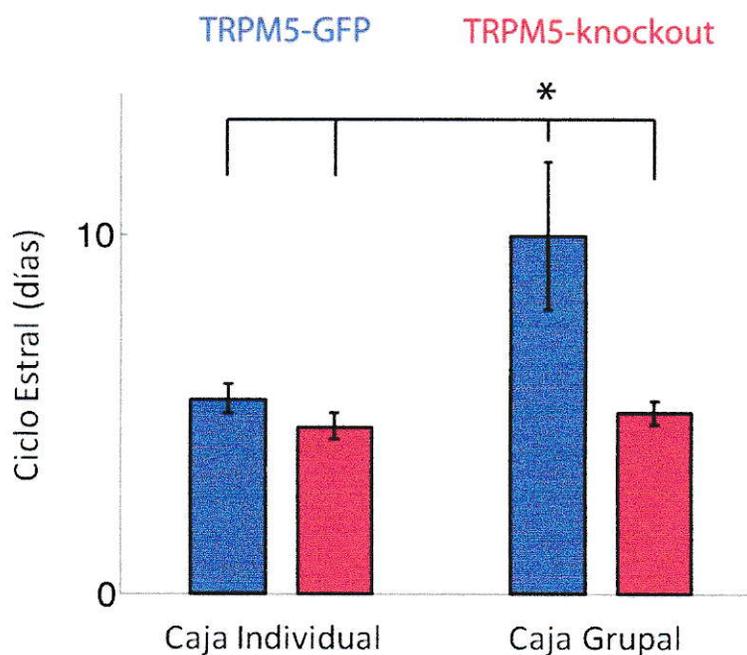
una hembra se encuentra en una caja grupal junto a varias hembras, y este efecto es revertido cuando las hembras son colocadas en cajas individuales.

Como mostré anteriormente (*Figura 21*), las NQs GFP<sup>+</sup> aisladas de los ratones TRPM5-KO-GFP no responden a DMP. Por lo tanto, para investigar si las hembras TRPM5-KO presentan el efecto *Lee-Boot* cuando se encuentran en cajas grupales (5 hembras), monitoreé cuánto se demoran en completar su ciclo estral. En la *Figura 23* se muestra que las hembras TRPM5-KO se demoran en promedio 5 días en completar su ciclo estral (n=10) cuando se encuentran en cajas grupales o individuales, mientras que las hembras TRPM5-GFP se demoran en promedio 10 días en completar su ciclo estral cuando se encuentran en cajas grupales y 5 días cuando se encuentran en cajas individuales (n=10).

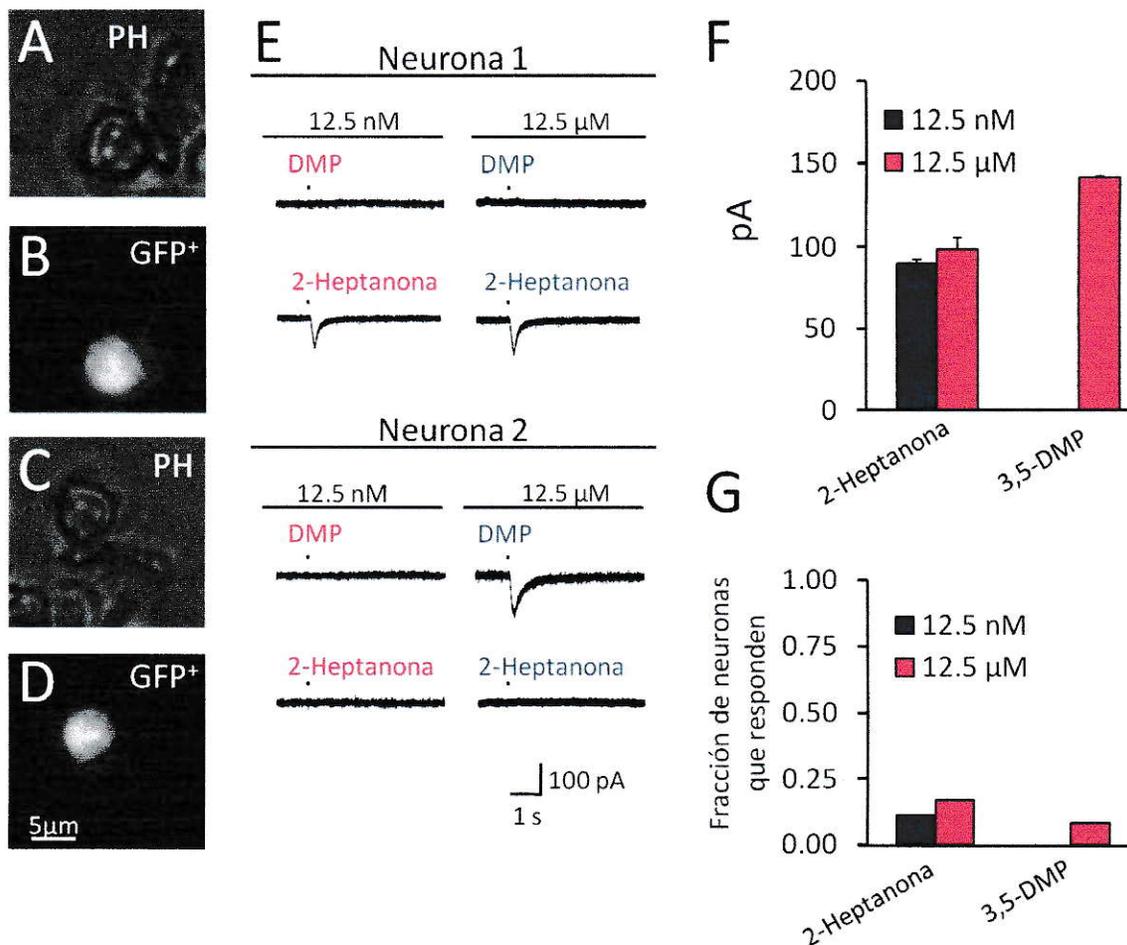
Esto muestra que las hembras TRPM5-KO no presentan el efecto *Lee-Boot*. Este efecto conductual en el ciclo estral apoya fuertemente la evidencia mostrada en este trabajo que las NQs que expresan el canal TRPM5 en el epitelio olfatorio principal están involucradas en la respuesta a feromonas en ratones.

#### **K. Las NQs TRPM5<sup>+</sup> del órgano vomeronasal responden a 2-heptanona y a DMP.**

El canal TRPM5 no solo está localizado en NQs del EOP, también es expresado en células con microvellosidades del EOP y en NQs del OVN y del sistemas gustativo (Lin y cols, 2007, Zhang y cols., 2003, Damak y cols., 2006). Con el fin de investigar como es la respuesta las NQs TRPM5<sup>+</sup> del OVN (*Figuras 24 A-D*), realicé registros de corrientes en NQs TRPM5<sup>+</sup> aisladas del órgano vomeronasal de ratones TRPM5-GFP.



**Figura 23. Los ratones *knockout* del canal TRPM5 no presentan el efecto *Lee-Boot*.** Ratones hembras TRPM5-GFP en cajas grupales (5 hembras por caja), muestran un incremento en la duración del ciclo estral en comparación a cuando se encuentran en cajas individuales (Barras azules). En contraste, los ratones *knockout* del TRPM5 en caja grupales no muestran una diferencia significativa en la duración del ciclo estral comparadas a cuando están en cajas individuales (Barras rojas). La duración del ciclo estral es diferente en cajas grupales en ratones TRPM5-GFP comparado a todos los otros ratones usando la prueba de Wilcoxon ranksum  $p < 0,0015$  con el valor de  $p$  corregido por la tasa de descubrimientos falsos ( $p < 0,03$ ).



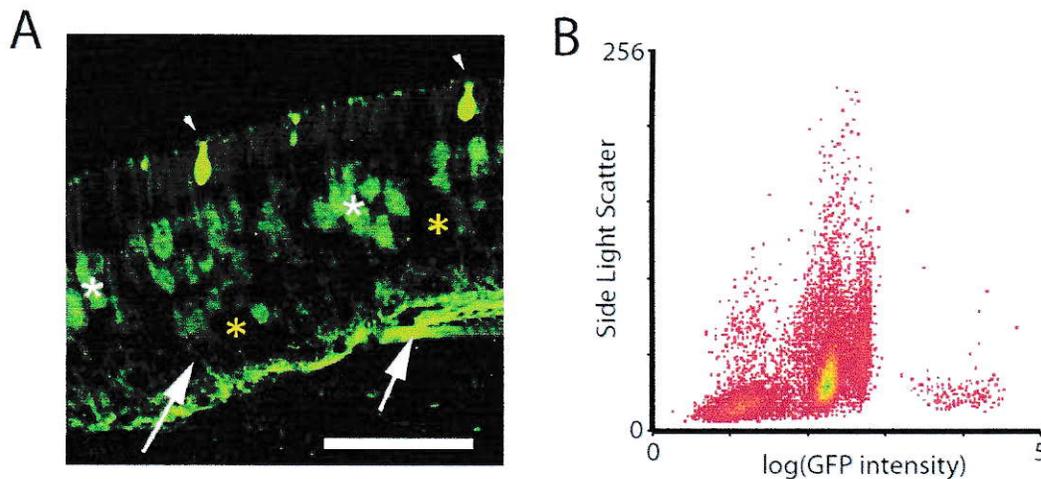
**Figura 24. NQs TRPM5<sup>+</sup> del órgano vomeronasal responden a 2-heptanona y a DMP.**

(A-D) Fotografías de NQs TRPM5<sup>+</sup> bajo contraste de fase (A y C) y bajo óptica de fluorescencia GFP (B y D). (E) Corrientes de *loose-patch* inducidas por la estimulación con 2-heptanona y DMP. (F) Amplitud del cambio de la corriente inducida por feromonas y (G) fracción de neuronas que responden a 2-heptanona y DMP (n=35).

La *Figura 24 E* muestra ejemplos representativos de las corrientes registradas en dos NQSS TRPM5<sup>+</sup>, estimuladas con 2-heptanona y DMP a concentraciones bajas (12,5) y concentraciones altas (12,5  $\mu$ M). Se observó que algunas neuronas respondieron únicamente a 2-heptanona a ambas concentraciones (Neurona 1), y otras solo respondieron a DMP a concentraciones altas (Neurona 2). En la *Figura 24 F* se muestran los promedios de las corrientes máximas evocadas en respuesta a las distintas concentraciones de 2-heptanona y DMP. La *Figura 24 G* muestra la fracción de neuronas que respondieron a la estimulación a diferentes concentraciones de ambas feromonas. Se observó que el número de NQSS TRPM5<sup>+</sup> del OVN que responden a 2-heptanona y DMP es menor que las del EOP (*Figura 14*). Además, ninguna NQSS TRPM5<sup>+</sup> del OVN respondió a DMP a concentraciones bajas (12,5 nM).

**L. Separación de NQSS TRPM5<sup>+</sup> y TRPM5<sup>-</sup> con la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Datos preliminares.**

Para poder responder la pregunta de: ¿Cuál es el receptor olfativo que expresan las NQSS TRPM5<sup>+</sup>? Es necesario separar las NQSS TRPM5<sup>+</sup> de las NQSS TRPM5<sup>-</sup>. Una vez separadas se puede aislar el ARN, y luego secuenciar el transcriptoma (*RNA-seq*; Keydar y cols., 2012), lo que permitiría determinar las diferencias de expresión de genes entre ambas poblaciones de NQSS. La *Figura 25* muestra un resultado preliminar obtenido usando el ratón TRPM5-GFP, que muestra que esta metodología puede ser usada para separar las células TRPM5<sup>+</sup> de las TRPM5<sup>-</sup>. Este resultado preliminar muestra que el FACS realizado de células aisladas de cinco ratones es suficiente para aislar un número mayor a 10<sup>6</sup> NQSS TRPM5<sup>+</sup> y TRPM5<sup>-</sup> necesarias para poder realizar el *RNA-seq*.



**Figura 25. Datos preliminares de FACS.**

(A) Sección del epitelio olfativo de un ratón TRPM5-GFP con un gran número de NQs TRPM5<sup>+</sup> (asteriscos blancos) y algunas NQs TRPM5<sup>-</sup> (asteriscos amarillos) también se muestra un pequeño número de células con microvellosidades que expresan altos niveles de GFP (cabeza de flecha) (otras regiones del epitelio tienen mayoritariamente NQs TRPM5<sup>-</sup>). (B) FACS de células nucleadas intactas aisladas del epitelio olfativo principal. Donde el zona correspondiente a las células con microvellosidades, NQs TRPM5<sup>+</sup> y NQs TRPM5<sup>-</sup> será determinado después de la separación de NQs por *sorting* usando el ratón TRPM5-GFP/OMP-tdTomato.

## DISCUSION

La motivación de mi tesis surgió de los diversos trabajos publicados en los últimos años que sostienen que tanto el órgano vomeronasal como el epitelio olfatorio principal pueden detectar tanto feromonas como odorantes en murinos, contrario a la visión anterior en la que se consideraba que el órgano vomeronasal era el sistema de detección de feromonas, mientras que el epitelio olfatorio principal era el sistema de detección de odorantes (Dulac y Torello, 2003; Halpern y Martinez-Marcos, 2003). En este sentido, diversas investigaciones muestran que un subconjunto minoritario de células mitrales del bulbo olfatorio principal, tal como las del OVN, proyectan a la amígdala medial (Baum, 2012; Thompson y cols., 2012; Pro-Sistiaga y cols., 2007; Kang y cols., 2009), contrario al pensamiento anterior que proponía que los axones de las NQs del EOP proyectaban únicamente al bulbo olfatorio principal, propagándose luego la señal a la corteza piriforme. Dichas observaciones ponían de manifiesto la necesidad de identificar la o las poblaciones de NQs del EOP capaces de reconocer feromonas. Evidencias previas (Lin y cols., 2007) sugerían que una pequeña población de NQs en el EOP que expresan el canal catiónico monovalente no selectivo TRPM5 estarían implicadas en la transducción de feromonas por un mecanismo desconocido.

### A. **Transducción feromonal en NQs TRPM5<sup>+</sup>**

La quimiotransducción de odorantes en las NQs se encuentra bien estudiada, no así la quimiotransducción de feromonas en el epitelio olfatorio principal. Diversos grupos han

mostrado que ratones *knockout* de la enzima ACIII y del canal CNGA2, presentan una conducta sexual y maternal deteriorada (Wang y cols., 2006; Mandiyan y cols., 2005; Belluscio y cols., 1998). Estas evidencias sugieren fuertemente un rol de la vía de transducción mediada por AMPc en la respuesta a feromonas en el EOP.

Estudios de inmunohistoquímica realizados sobre el epitelio olfatorio completo muestran la presencia del canal TRPM5 en la capa ciliar del EOP, y que este pudiese colocalizar con el canal CNGA2 (Lin y cols., 2007), pero no se puede precisar la localización específica debido a la baja resolución de las imágenes que permite esta técnica en el epitelio. Mis resultados de inmunocitoquímica que permiten mayor resolución, muestran que en NQsS individuales el canal activado por nucleótido cíclico CNGA2 es expresado en los cilios de las NQsS TRPM5<sup>+</sup> y TRPM5<sup>-</sup>, y que el canal de cloruro activado por Ca<sup>2+</sup> ANO2 no se encuentra en las NQsS TRPM5<sup>+</sup>, pero sí en las TRPM5<sup>-</sup>; el canal TRPM5, por el contrario, se encuentra en las TRPM5<sup>+</sup> pero no en las TRPM5<sup>-</sup>. Si bien mis resultados de inmunocitoquímica muestran que el canal TRPM5 y el canal CNGA2 colocalizan, no es posible con estos experimentos saber si el canal TRPM5 se encuentra localizado exclusivamente en los cilios olfatorios, ya que los experimentos se hicieron en NQsS aisladas del ratón TRPM5-GFP en los cuales la GFP es expresada bajo el promotor de TRPM5 en toda la NQs y no como una proteína de fusión. Para poder determinar si el canal TRPM5 se encuentra expresado en los cilios sería necesario realizar experimentos de inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo contra este canal. Los resultados mencionados demuestran la existencia de dos subpoblaciones de NQsS claramente distinguibles entre sí en este neuroepitelio.

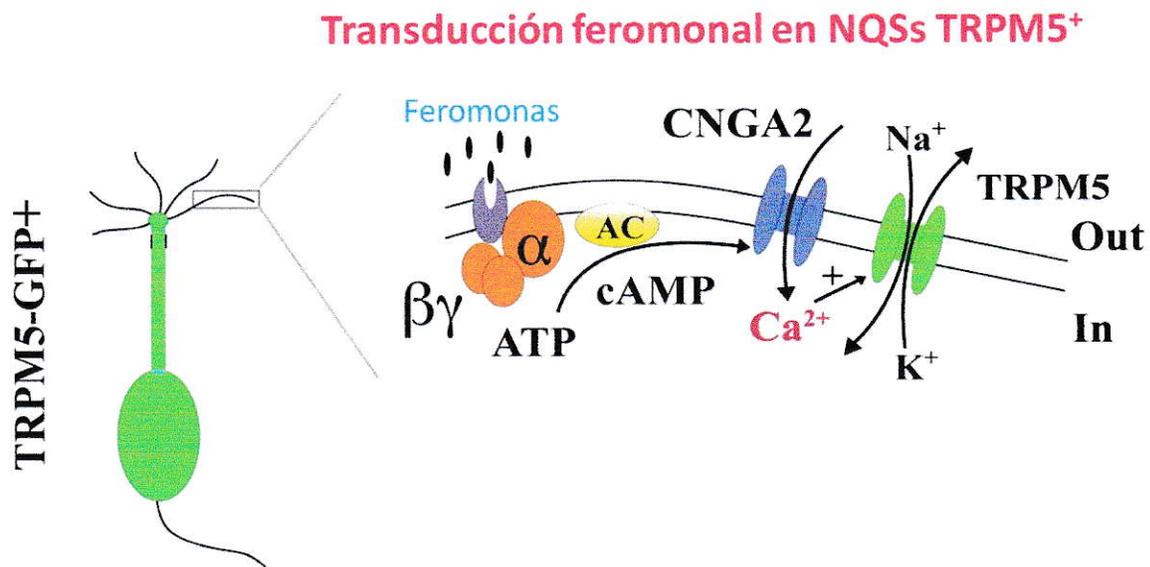
Estudios previos habían mostrado que ratones TRPM5 *knockout* no presentan cambios significativos en la respuesta eléctrica inducida por feromonas en registros de EOG (Wang y cols., 2006, Lin y cols., 2004; Spehr y cols., 2006) ni en el test olfativo conductual de discriminación de odorantes (*go-no go*; Lin y cols., 2007). Esto podría deberse a que el canal TRPM5 se expresa solo en ~5% de la población total de NQs del EOP (Lin y cols., 2007). En ese mismo trabajo se observó una activación de los glomérulos GFP<sup>+</sup> en el bulbo olfatorio principal tras ser tratados con DMP u orina de ratón, a través de un ensayo de detección de actividad neuronal de la proteína c-Fos expresada en las células periglomerulares. Todas estas evidencias no permitían concluir que las NQs que expresan TRPM5 reconocieran feromonas, y hacían necesario un estudio en NQs TRPM5<sup>+</sup> aisladas.

Tanto los registros eléctricos de célula única como las imágenes de Ca<sup>2+</sup> intraciliar muestran la existencia de una población específica de NQs del EOP, correspondiente a aquellas que expresan el canal TRPM5, que responden de manera selectiva a feromonas de ratón, mientras que la subpoblación mayoritaria, NQs TRPM5<sup>-</sup>, pueden responder tanto a odorantes como a feromonas. Estas últimas reconocerían ambas moléculas como odorantes. En este trabajo también mostré que el bloqueador del canal TRPM5 (TPPO), bloqueó parcialmente la respuesta a feromonas en las neuronas TRPM5<sup>+</sup>, pero no afectó la respuesta a odorantes ni a feromonas en las TRPM5<sup>-</sup>. Mostré además que el inhibidor del canal ANO2 (ácido niflúmico) suprimió parcialmente la respuesta a feromonas y odorantes en las NQs TRPM5<sup>-</sup>, pero no en las NQs TRPM5<sup>+</sup>. Esto demuestra que el canal TRPM5 es el principal responsable de la corriente en las NQs TRPM5<sup>+</sup>, mientras que en las NQs TRPM5<sup>-</sup> es un canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup>. El bloqueo de estos canales dejan en ambos casos una corriente remanente relativamente pequeña. Como la única vía de ingreso de Ca<sup>2+</sup>

al cilio es del medio extracelular a través del canal CNGA2, esto sugiere que la corriente remanente corresponde a la entrada de cationes por este canal. El bloqueo con *L-cis*-diltiazem del CNGA2 no suprime por completo las corrientes inducidas por feromonas en las NQs TRPM5<sup>+</sup>, debido probablemente a que *L-cis*-diltiazem no bloqueó por completo al canal. Las imágenes de Ca<sup>2+</sup> sí fueron suprimidas completamente, la resolución en estos experimentos es menor que la de los experimentos de *loose-patch*.

En NQs TRPM5<sup>+</sup> en ausencia de Ca<sup>2+</sup> inesperadamente se observaron corrientes de mayor tamaño que en presencia de Ca<sup>2+</sup>, las cuales no se vieron afectadas con TPPO pero si se inhibieron en gran parte con *L-cis*-diltiazem. Una posible explicación para esta observación es que en ausencia de Ca<sup>2+</sup> no se produzca la inhibición del canal CNGA2 que normalmente ejerce el Ca<sup>2+</sup>, de manera que el Na<sup>+</sup> fluiría más libremente por éste. Observaciones similares fueron obtenidas por otro grupo de investigadores (Frings y cols., 1995).

Toda esta evidencia experimental permite proponer que la activación del canal TRPM5 es mediada por la generación de AMP cíclico y la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través del canal CNGA2, y que en conjunto dan cuenta del potencial de receptor. En contraste, las NQs TRPM5<sup>-</sup> que constituyen la mayoría de las NQs del EOP y como estaba descrito, pueden responder a odorantes y feromonas y expresan un canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup>, aunque emplean la misma vía de señalización. Las NQs que expresan ANO2 pueden responder también a feromonas, probablemente debido a que estas moléculas pueden ser detectadas por los receptores a odorantes de las NQs. El mecanismo de quimiotransducción en las NQs TRPM5<sup>+</sup>, se ilustra en la *Figura 26*.



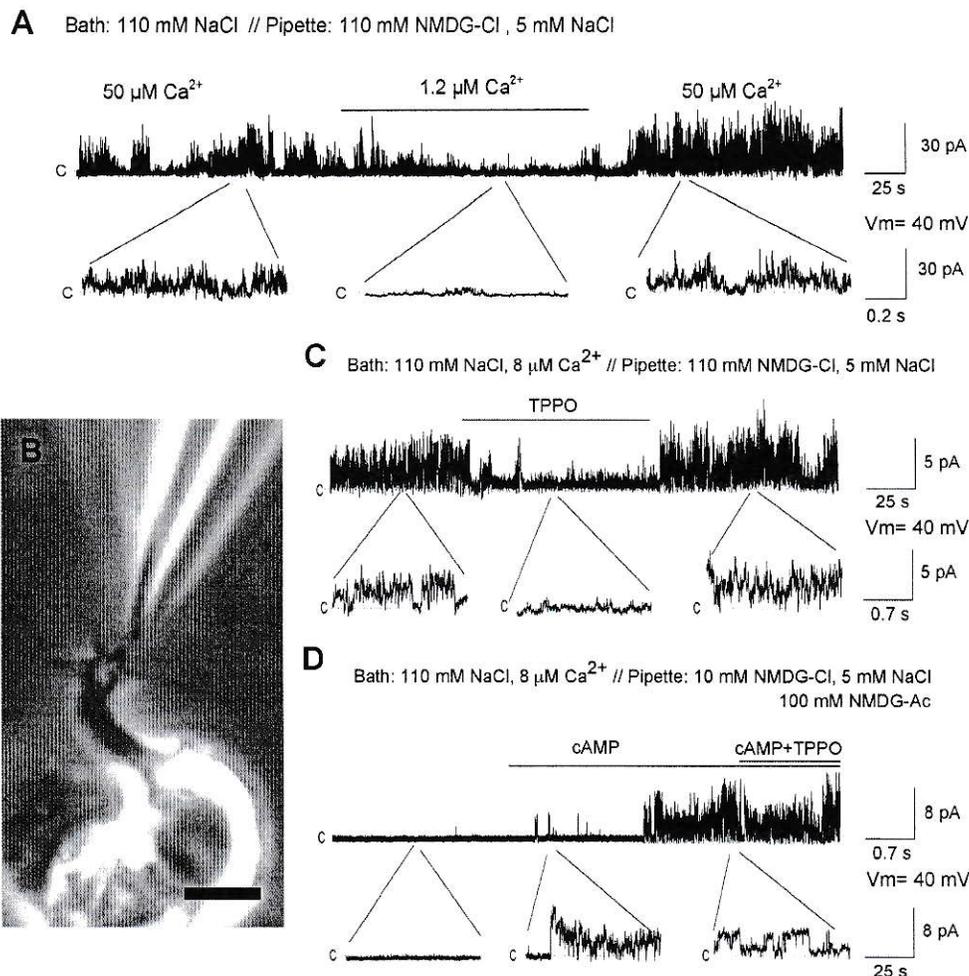
**Figura 26. Diagrama que muestra la vía de transducción a feromonas en los cilios de las NQs TRPM5 positivas.**

La transducción a feromonas comienza con la activación de un receptor de feromona que activa a una proteína G que activa a su vez a una enzima adenilato ciclasa tipo III (ACIII), la cual cataliza la producción de AMPc, abriendo el canal gatillado por nucleótidos cíclicos (CNG), por el cual entra  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$ , despolarizando la membrana. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  abre a su vez al canal TRPM5 despolarizando aún más a la membrana debido a un flujo de entrada de  $\text{Na}^{+}$ .

Mis resultados también proveen una explicación a la conducta de discriminación de odorantes en los ratones *knockout* del TRPM5 (*go-no go*, Lin y cols., 2007), el cual no mostró diferencias significativas en comparación al ratón silvestre, debido probablemente a que las NQs TRPM5<sup>+</sup> responden tanto a odorantes como a feromonas. Esto sugiere que estas NQs responden a ambos estímulos en los ratones *knockout* del TRPM5.

#### **B. Confirmación de la presencia de un canal TRPM5 funcional en los cilios de las NQs que lo expresan.**

Todas las evidencias mostradas hasta el momento no son totalmente convincentes sobre la localización del canal TRPM5 en los cilios de las NQs. Sin embargo, registros de corrientes inducidas por Ca<sup>2+</sup> en parches escindidos en modalidad *inside-out* de cilio de una NQ TRPM5<sup>+</sup>, realizados por el Dr. Ricardo Delgado, verifican que las NQs TRPM5<sup>+</sup> expresan un canal catiónico no específico (TRPM5) funcional en los cilios (*Figura 27*). Las corrientes eran consistente con un canal que conduce cationes dependiente de Ca<sup>2+</sup>, debido a que el canal incrementa dramáticamente su actividad cuando la concentración de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático cambia de 1,2 a 50 μM; los experimentos se hicieron en una solución con un gradiente de Na<sup>+</sup> libre de K<sup>+</sup>. (*Figura 27 A*, Hofmann y cols., 2003; Liu y Liman, 2003). La identidad del TRPM5 fue confirmada al bloquearlo de manera reversible con TPPO (150 μM) a 8 μM de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático (*Figura 27 C*). Adicionalmente, en todas las NQs TRPM5<sup>+</sup> que se probaron, los parches fueron silentes en presencia de Ca<sup>2+</sup> suficiente para activar al TRPM5 (8 μM), pero la aplicación de AMPc indujo actividad, revelando la presencia del canal CNG y confirmando que el canal TRPM5 no se encuentra en las NQs



**Figura 27. Registros de *patch-clamp inside-out* obtenidos desde el cilio de las NQSs TRPM5<sup>+</sup>.**

En presencia de 110 mM de NaCl en el baño (citoplasmático) y 110 mM de NMDG-Cl y 5 mM de NaCl en la pipeta (extracelular). **(A)** TRPM5<sup>+</sup>: Incremento del Ca<sup>2+</sup> del baño de 1.2  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  muestra un incremento en la apertura del canal obteniéndose una corriente de salida. (n=3) **(B)** Fotografía de contraste de fase de *patch-clamp* en el cilio de una NQSs TRPM5<sup>+</sup>. Barra 2  $\mu\text{m}$ . **(C)** TRPM5<sup>+</sup>: 150  $\mu\text{M}$  de TPPO inhibe la corriente de salida ciliar medida en presencia de 8  $\mu\text{M}$  de Ca<sup>2+</sup> en el baño. (n=3) **(D)** TRPM5<sup>-</sup>: *patch-clamp* de cilios de NQSs TRPM5<sup>-</sup>. Exposición en el medio a AMPc (100  $\mu\text{M}$ ) muestra la apertura de un canal que no es inhibido por TPPO (150  $\mu\text{M}$ ) (n=4). Dr. Ricardo Delgado.

convencionales (*Figura 27 D*). Este resultado reafirma la presencia del canal TRPM5 en los cilios de las NQs TRPM5<sup>+</sup>.

### **C. Análisis de las concentraciones de feromonas a las que responden las NQs del EOP y del OVN.**

Anteriormente se había reportado una población de NQs en el EOP capaz de responder a dos feromonas ( $\beta$ -feniletilamina e isopentilamina), que son aminas que producen respuestas aversivas en los ratones a concentraciones de 0,01 nM (Ferrero y cols., 2011). Estas neuronas expresan receptores asociados con las trazas de aminas (TAAR3 y TAAR4; Zhang y cols., 2013). También, se habían observado respuestas a péptidos del MHC en el EOP a concentraciones de 0,01 nM (Spher y cols., 2006), pero se desconocía la identidad de la población de NQs que reconocen estos péptidos. En mi trabajo mostré que las NQs TRPM5<sup>+</sup> responden a estos péptidos a concentraciones de al menos 12,5 nM. Estas neuronas también responden a la misma concentración de DMP. No se habían previamente observado respuestas a esta molécula en células aisladas del EOP, sino solo en NQs del OVN, las cuales responden a este compuesto a concentraciones de 100 nM (Leinders-Zufall y cols., 2000). Esto es particularmente relevante, ya que los ratones *knockout* del TRPM5 no presentan el efecto *Lee Boot* (efecto feromonal), una conducta asociada a la exposición a DMP (Novotny y cols., 1986; Ma y cols., 1998). Al igual que para esta última feromona, solo se habían observado respuestas a 2-heptanona a concentraciones de 50 y 100  $\mu$ M en ratones usando la técnica de electroolfatograma (Wang y cols., 2006; Lin y cols., 2007); en este trabajo mostré que las NQs TRPM5<sup>+</sup> también responden a esta molécula, pero a una concentración de solo 12,5 nM. Las NQs del OVN

responden a 2-heptanona a concentraciones de 0,1 nM (Leinders-Zufall y cols., 2004; Leinders-Zufall y cols., 2000). Finalmente las NQs TRPM5<sup>+</sup> no responden a farneseno incluso cuando son expuestas a concentraciones elevadas (12,5 μM), mientras que las NQs del OVN responden a esta feromona a concentraciones de 0,1 nM (Leinders-Zufall y cols., 2000). Es decir, tanto las NQs TRPM5<sup>+</sup> como las NQs del OVN reconocen feromonas a concentraciones del orden nanomolar.

#### **D. ¿Cuál es el receptor expresado en las NQs TRPM5<sup>+</sup>?**

Las NQs del OVN son muy selectivas en la detección de feromonas, ya que incluso a concentraciones elevadas parecen reconocer solo una única feromona (Leinders-Zufall y cols., 2000), mientras que algunas de las NQs TRPM5<sup>+</sup> estudiadas en el presente trabajo respondieron a más de una feromona; sin embargo, ninguna de ellas respondió a la mezcla de odorantes. Esto sugiere que los receptores de feromonas expresados en el OVN y aquellos del EOP son diferentes. Para corroborar esto sería necesario identificar cual es el receptor expresado en las NQs TRPM5<sup>+</sup>. Para esto primero se tendrán que separar las NQs TRPM5<sup>+</sup> de las TRPM5<sup>-</sup>. Resultados preliminares muestran que la técnica de FACS permite aislar un número mayor a 10<sup>6</sup> NQs TRPM5<sup>+</sup> y TRPM5<sup>-</sup> a partir de cinco ratones TRPM5-GFP. Esta técnica tiene la limitante que las NQs no son las únicas células que expresan TRPM5 en el EOP, también las células con microvellosidades lo expresan. Una alternativa para esta limitante sería utilizar un ratón que exprese la proteína fluorescente tdTomato (rojo) bajo el promotor de la proteína OMP (específica de NQs) con el ratón TRPM5-GFP, obteniéndose un ratón TRPM5-GFP/OMP-tdTomato. De este ratón se podrían separar las NQs TRPM5<sup>+</sup> de las TRPM5<sup>-</sup> aislando NQs con fluorescencia verde

de aquellas que expresan GFP bajo el promotor de TRPM5 y se podrá separar las neuronas olfativas del resto de las células del EOP aislando NQS con fluorescencia roja de aquellas que expresan tdTomato bajo el promotor de la proteína específica de NQS OMP.

**E. La estimulación con feromonas induce incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  en los cilios en microdominios.**

Las imágenes de  $\text{Ca}^{2+}$  en el cilio de las NQs  $\text{TRPM5}^+$  muestran un incremento en el calcio cuando fueron estimuladas con feromonas, pero no con odorantes, reforzando la idea que estas NQs son especializadas en la detección de feromonas. La longitud de los cilios donde se realizaron los experimentos de imágenes de  $\text{Ca}^{2+}$  era solo de  $\sim 1 \mu\text{m}$  de largo, debido a que gran parte del cilio se pierde durante el proceso de disociación mecánica, mientras que en el epitelio olfatorio intacto estos tienen entre 20 a 200  $\mu\text{m}$  de largo en las distintas especies de vertebrados (Lidow y Menco, 1984). A pesar de ello pude medir incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales ocurren como un único evento localizado en diferentes puntos a lo largo del cilio. Estudios previos en NQs aisladas de anfibios (Castillo y cols., 2010) cuyos cilios se conservan mejor luego de la disgregación mecánica, muestran incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  en los cilios inducidos por compuestos enjaulados que activan la vía de AMPc, en microdominios de entre 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  (observaron más de un microdominio en 1  $\mu\text{m}$ ). En murinos los microdominios podrían encontrarse más alejados unos de otros. Para corroborar esto sería necesario obtener imágenes de  $\text{Ca}^{2+}$  en cilios de mayor longitud. Datos preliminares muestran que en cilios más largos ( $\sim 8 \mu\text{m}$ ) hay más de un microdominio, separados cada  $\sim 2 \mu\text{m}$ .

**F. Comparación de la latencia, la amplitud máxima y la cinética de relajación entre las corrientes y los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$ .**

La latencia de los eventos de fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  después de la estimulación con la mezcla de feromonas era mucho más larga ( $\sim 3$ - $5$  s) que la de la corriente inducida por la mezcla de feromonas ( $\sim 0,1$  s). Esta diferencia podría atribuirse a la intensidad del estímulo (presión del pulso de feromona y distancia a la que esté era aplicado). En los experimentos de fluorescencia los compuestos fueron agregados directamente al baño, mientras que en los registros de *loose-patch* la estimulación se realizó con una pipeta de dos cañones posicionada a solo  $\sim 10$   $\mu\text{m}$  de los cilios y con un presión de  $\sim 3$  psi. De estos factores no sólo depende la concentración final de odorantes en cada punto de la superficie celular, sino también la rapidez con que se alcanza el nivel requerido para generar una respuesta observable (latencia). Los registros de calibración ilustran este hecho, puesto que la latencia de la corriente de entrada de potasio depende claramente de la distancia desde donde se aplica el estímulo y de la presión con la se estimula.

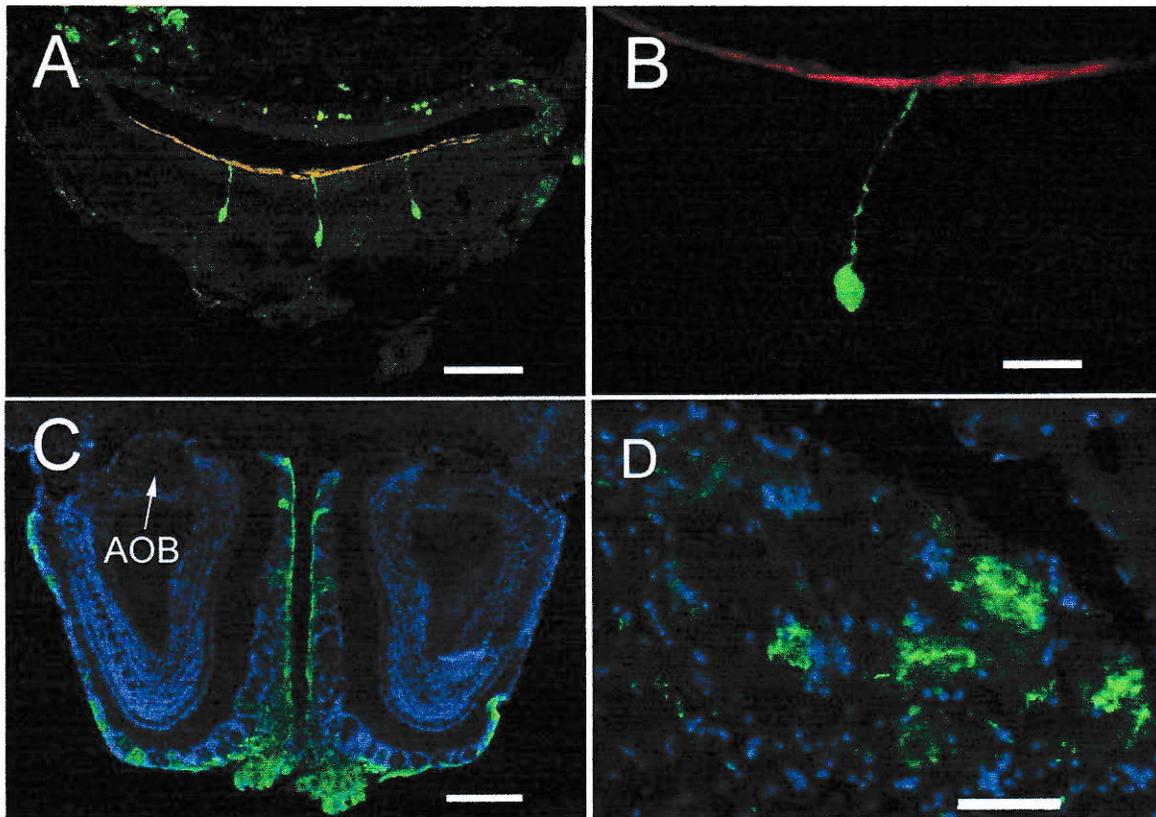
La amplitud máxima de las corrientes y la de los eventos de fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se alcanza a tiempos similares ( $\sim 0,25$  s). Con este resultado se puede especular que el canal TRPM5 que es el principal responsable de la corriente evocada, se encuentre localizado junto al canal CNGA2 en un microdominio. De esta manera el canal TRPM5 alcanzaría el umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para ser activado ( $0,3$  a  $1$   $\mu\text{M}$ ) al mismo tiempo que se registra el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  con la sonda fluorescente, como se ha descrito para el canal de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , que se postula podría estar tan cerca como  $20$  nm (Castillo y cols., 2010).

La terminación de la respuesta inducida por odorantes requiere que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intraciliar regrese a su niveles basales, a través de la remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  por una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en la membrana plasmática (PMCA; Weeraratne y cols., 2006; Castillo y cols., 2007), que tiene una alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_m = 2-4$  nM) y una baja capacidad de transporte ( $\sim 10^2$   $\text{Ca}^{2+}/\text{s}$ ) (Carafoli y Brini, 2000); y por un intercambiador  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (NCX; Reisert & Matthews, 1998) que es electrogénico ( $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ ), y que tiene una afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  10 veces menor, y una capacidad de transporte hasta 50 veces mayor que la PMCA (Blaustein y Lederer, 1999). Mis resultados muestran que la cinética de relajación de la corriente inducida por feromonas en la NQS TRPM5<sup>+</sup> es más rápida ( $< 1\text{s}$ ), que lo que se demora en regresar a los niveles basales las señales de fluorescencia ( $\sim 8$  s). La cinética de relajación de la fluorescencia es comparable con lo observado en la literatura usando microscopía confocal convencional en cilios olfatorios de salamandra estimulados con odorantes ( $\sim 7$  s; Leinders - Zufall y cols., 1998). Esta diferencia podría deberse a que la afinidad del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  (X-rhod-1) en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  es mayor que la de la PMCA y la del NCX ( $\sim 700$  nM). Esto sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  no se encuentra totalmente disponible para ser removido, lo que afectaría la cinética de remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el cilio, ocasionando que este proceso sea más lento. Adicionalmente, la vía del AMPc está sujeta a una regulación mediante retroalimentación negativa, la cual ocurre a través del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, que reduce la afinidad de los canales CNG por AMPc (Chen y Yau, 1994). Por otro lado, el canal TRPM5 se encuentra desactivado a concentraciones menores a  $0,3$   $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  lo que implicaría que la corriente a través del canal TRPM5 cesaría antes que el  $\text{Ca}^{2+}$  fuera removido a su nivel basal, que en los cilios se ha descrito

sería de 40 nM (Leinders-Zufall y cols., 1997), y por lo tanto ambos canales se encontrarían cerrados antes que se alcance el nivel basal de  $\text{Ca}^{2+}$  en el cilio.

### G. Importancia fisiológica de las NQSS TRPM5<sup>+</sup> en el EOP.

Todos los resultados discutidos hasta el momento sugieren fuertemente que la población de NQSS TRPM5<sup>+</sup> al menos parcialmente forman parte de la habilidad del epitelio olfatorio principal de responder a feromonas por un mecanismo de transducción que implica a la vía del AMPc, la cual induce una variedad de comportamientos de tipo feromonal en el ratón (Belluscio y cols., 1998; Mandiyan y cols., 2005; Wang y cols., 2006; Wang y Storm, 2011). Considerando lo anterior, es esperable que la carencia del canal TRPM5 produzca una deficiencia en alguna conducta feromonal en los ratones. Mis resultados muestran que las hembras de los ratones *knockout* del canal TRPM5 no presentan el efecto *Lee Boot* (Ma, 1998) cuando se encuentran en cajas grupales. Efecto mediado por una señal química (DMP) reconocida a través del olfato (Koyama, 2004). El canal TRPM5 no solo está localizado en NQSS del EOP, sino que también es expresado en células con microvellosidades del EOP y en NQSS del OVN y del sistema gustativo (Lin y cols, 2007, Zhang y cols., 2003, Damak y cols., 2006), por lo que el efecto conductual observado podría deberse al reconocimiento de DMP por las NQSS del EOP o del OVN o por ambas. Tanto las NQSS TRPM5<sup>+</sup> del OVN y como las del EOP proyectan a la amígdala medial (Baum, 2012; Thompson y cols., 2011; Pro-Sistiaga y cols., 2007; Kang y cols., 2009), pero el porcentaje de NQSS del OVN que expresan TRPM5 es muy bajo ~1% (*Figura 28*). Además, solo el 8% de las NQSS TRPM5<sup>+</sup> del OVN respondieron a DMP en registros de *loose-patch*, mientras que el 28% de las NQSS TRPM5<sup>+</sup> del EOP respondieron



**Figura 28. Inmunohistoquímica del órgano vomeronasal.**

(OVN, **A** y **B**) y del bulbo olfatorio accesorio (AOB, **C** y **D**) muestran la fluorescencia de GFP (verde) en ratones TRPM5-GFP, la marcación del anticuerpo contra la proteína  $G_o$  (rojo) y la marca nuclear con DAPI (azul). (**A**) y (**B**). La fluorescencia de GFP fue encontrada en un pequeño número de neuronas sensoriales del VNO (Entre 1-3 células de un 30% de la sección del epitelio vomeronasal). (**C**). Como se esperaba de estudios previos (Lin y cols., 2007) la fluorescencia de GFP fue mayor en el glomérulo del EOP pero la fluorescencia fue mucho menor en el AOB. (**D**). Al incrementar la ganancia de la fluorescencia 10 veces se observó un pequeño número de axones marcados con GFP en el AOB. Los axones fluorescentes en el AOB corresponden a las neuronas vomeronasales que expresan GFP. Barra: A: 90  $\mu\text{m}$ , B: 30  $\mu\text{m}$ , C: 200  $\mu\text{m}$  y D: 20  $\mu\text{m}$ .

a esta feromona. Esto sugiere que el efecto conductual observado se debería principalmente a las NQSs TRPM5<sup>+</sup> del EOP. Este resultado apoya fuertemente la evidencia que da cuenta que el canal TRPM5 está involucrado en la transducción de feromonas. Además, indica que estas neuronas tendrían un rol fisiológico importante en la regulación del ciclo estral de los ratones.

#### **H. Posible respuesta a feromonas en humanos y primates superiores.**

Por el momento una de las evidencias que dan cuenta de una posible respuesta a feromonas en el ser humano ha sido reportada por Stern y McClintock (1998), que muestran que compuestos sin olor de las axilas de las mujeres que se encontraban en la fase folicular tardía de sus ciclos menstruales aceleraban el pico preovulatorio de la hormona luteinizante de las mujeres que fueron expuestas a estas moléculas, generándose un acortamiento de sus ciclos menstruales equivalente al efecto *Lee Boot* en ratones. El aporte de esta tesis es particularmente relevante para futuros estudios en humanos y en primates superiores, donde se sospecha que podrían existir respuestas a feromonas, a pesar de que no cuentan con un sistema vomeronasal funcional (Trotier, 2011), pero si expresaran el canal TRPM5 en NQSs del EOP, tal vez podrían responder a feromonas a través de esta subpoblación de neuronas. Esta investigación realza la pregunta si es que la respuesta a feromonas en primates superiores es mediada por neuronas quimiosensoriales del epitelio olfatorio principal. Y si esto fuera así: ¿En qué medida los estados psicológicos y de comportamiento en humanos podrían depender de feromonas? ¿Qué contexto sería necesario para estos efectos? Los ratones *knockout* del TRPM5 no presentan el efecto *Lee Boot*, mostrando que posiblemente las NQSs que expresan TRPM5 juegan un rol clave en

la regulación del ciclo estral de los ratones, y ya que en humanos el único efecto de comportamiento descrito ocurre precisamente a nivel de la regulación del ciclo menstrual. Cabe preguntarse si este efecto en el ciclo menstrual de las mujeres podría ser mediado por NQs que expresan TRPM5 en el EOP humano.

**BIBLIOGRAFIA**

Allende, M., Bono, M.R., Echeverría, M., Guiliani, N., Gysling, K., Handford, M., López, M., Núñez, S., Sanhueza, A., Vargas, V., Venegas, A. (2008). "Manual de normas de Bioseguridad". Fondecyt-Conicyt 1:139.

Andrade, E.L., Meotti, F.C., Calixto, J.B. (2011). "TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs". *Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 133: 189–204.

Axel R. (2005). "Scents and sensibility: a molecular logic of olfactory perception (Nobel lecture)". *Angewandte Chemie (International. ed. in English)*, 44:6110-6127.

Bakalyar, H.A., y Reed, R.R. (1990). "Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection". *Science* 250, 1403-1406.

Baker, H., Cummings, D.M., Munger, S.D., Margolis, J.W., Franzen, L., Reed, R.R., y Margolis, F.L. (1999). "Targeted deletion of a cyclic nucleotide-gated channel subunit (OCNC1): biochemical and morphological consequences in adult mice". *Journal of Neuroscience* 19, 9313-9321.

Baum MJ. (2012). "Contribution of pheromones processed by the main olfactory system to mate recognition in female mammals". *Frontiers in Neuroanatomy*. 6:20.

Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, A., Axel, R. (1998). "Mice deficient in G(olf) are anosmic". *Neuron*. 20(1):69-81.

Blaustein, M.P., Lederer, W.J. (1999). "Sodium/calcium exchange: its physiological implications". *Physiological Review*. 79(3):763-854.

Boehm, U., Zou, Z., Buck, L.B. (2005). "Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction". *Cell* 123, 683-695.

Borisy, F.F., Ronnett, G.V., Cunningham, A.M., Julifs, D., Beavo, J., Snyder, S.H. (1992). "Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons". *Journal of Neuroscience*. 12:915–923.

Brunet, L.J., Gold, G.H, Ngai, J. (1996). "General Anosmia Caused by a Targeted Disruption of the Mouse Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel". *Neuron*. (17): 681-693.

Brechbühl, J., Luyet, G., Moine, F., Rodriguez, I., Broillet, M. C. (2011). "Imaging Pheromone Sensing in a Mouse Vomeronasal Acute Tissue Slice Preparation". *Journal of Visual Experiments* (58), e3311, doi:10.3791/3311.

Buck, L., (2000). "The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals". *Cell*, 100:611-618.

Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D., Hecker, E. (1959). "Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution". *Naturforsch*, 14: 283–284.

Castillo, K., Delgado, R., Bacigalupo, J. (2007) "Plasma membrane Ca(2+)-ATPase in the cilia of olfactory receptor neurons: possible role in Ca(2+) clearance". *The European Journal of Neuroscience*. Nov;26(9):2524-31.

Castillo, K., Restrepo, D., y Bacigalupo, J. (2010). "Cellular & molecular Ca<sup>2+</sup> microdomains in olfactory cilia support low signaling amplification of odor transduction". *European Journal of Neuroscience* 32, 932-938.

Carafoli, E., Brini, M. (2000). "Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport". *Current Opinion in Chemical Biology*. Apr;4(2):152-61.

Carr, V.M. y Farbman, A.I. (1993) "The dynamics of cell death in the olfactory epithelium". *Experimental Neurology*. 124(2):308-14.

Chen y Yau. (1994). "Direct modulation by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons". *Nature*, 368, 545–548.

Chess, A., Simon, I., Cedar, H., Axel, R. (1994). "Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression". *Cell*, 78:823-834.

Clapham, D.E., Neer, E.J. (1997). "G protein beta gamma subunits". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37: 167–203.

Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C., Schultz, G. (2005). "International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels". *Pharmacology Review*, 57:427–450.

Clapp, T.R., Medler, K.F., Damak, S., Margolskee, R.F., Kinnamon, S.C. (2006). "Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25". *BMC Biology*, 4, 7.

Cosens, D.J., Manning, A. (1969). "Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant". *Nature*, 224:285-287.

Curran-Everett, D. (2000). "Multiple comparisons: philosophies and illustrations". *American Journal Physiology Regular Integrative Comparative Physiology*, 279, R1-R8.

- Dai, Y., Zhang, J.H. (2001). "Role of  $Cl^-$  current in endothelin-1 induced contraction in rabbit basilar artery". *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 281(5):H2159-67.
- Damak, S., Shigemura, N., Yoshida, R., Mosinger, B. Jr., Glendinning, J.I., Ninomiya, Y., Margolskee, R.F. (2006) "Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds". *Chemical Senses*. Mar;31(3):253-64.
- Delay, R., y Restrepo, D. (2004). "Odorant responses of dual polarity are mediated by cAMP in mouse olfactory sensory neurons". *Journal of Neurophysiology* 92: 1312–1319.
- Ding, Y., and Wilkins, D. (2004). "The effect of normalization on microarray data analysis". *DNA and cell biology*, 23, 635-642.
- Dorries, K. M., Adkins-Regan, E., Halpern, B. P. (1995). "Olfactory sensitivity to the pheromone, androstenone, is sexually dimorphic in the pig". *Physiology Behavior*. 57:255-259.
- Doving, K.B., Trotier, D. (1998). "Structure and function of the vomeronasal organ". *Journal of Experimental Biology*, 201: 2913–2925.
- Duchamp-Viret, P., Chaput, M.A., y Duchamp, A. (1999). "Odor response properties of rat olfactory receptor neurons". *Science* 284: 2171–2174.
- Dulac, C., y Torello, A.T. (2003). "Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behavior". *Nature Review in Neuroscience*, 4, 551-562.
- Ferrero, D.M., Lemon, J.K., Fluegge, D., Pashkovski, S.L., Korzan, W.J., Datta, S.R., Spehr, M., Fendt, M., Liberles, S.D. (2011) "Detection and avoidance of a carnivore odor by prey". *Proceeding of the National Academy of Science* 108:11235–11240.
- Finger, T., Restrepo D., y Silver, W., (2000). "The Neurobiology of taste and smell". 2nd edition. Wiley-Liss. Firestein, S., (2001). "How the olfactory system makes sense on scents". *Nature*, 413:211-218.
- Firestein, S., Werblin, F. (1989) " Odor-Induced Membrane Currents in Vertebrate-Olfactory Receptor Neurons". *Science* 244, 79-82.
- Firestein S. (2001). "How the olfactory system makes sense of scents". *Nature*. 13;413(6852):211-8.
- Frings, S., Seifert, R., Godde, M., Kaupp, UB. (1995). "Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels". *Neuron*, Jul;15(1):169-79.

Giacobini, P., Benedetto, A., Tirindelli, R., Fasolo, A. (2000). "Proliferation and migration of receptor neurons in the vomeronasal organ of the adult mouse". *Brain Research*, 123: 33–40.

Gire, D.H., Restrepo, D., Sejnowski, T.J., Greer, C., De Carlos, J.A., Lopez-Mascaraque, L. (2013). "Temporal processing in the olfactory system: can we see a smell?" *Neuron* 8;78(3):416-32.

Glusman, G., Yanai, I., Rubin, I., y Lancet, D. (2001). "The complete human olfactory subgenome". *Genome Research*, 11:685-702.

Gonzalez-Silva, C., Vera, J., Bono, M.R., Gonzalez-Billault, C., Brooke, B., Hansen, A., Lopez, R., Gibson, E.A., Restrepo, D., y Bacigalupo, J. (2013). "Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels of the ClCa family express in the cilia of a subset of rat olfactory sensory neurons". *PLoS One* In press.

Graziadei, P.P.C y Graziadei, G.A.M. (1979) "Neurogenesis and neuron regeneration in olfaction system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons". *Journal of Neurocytology*. 8:1-18.

Haberly, L.B. (2001) "Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry". *Chemical Senses*, 26:551-576.

Halpern, M., y Martinez-Marcos, A. (2003). "Structure and function of the vomeronasal system: an update". *Progress in Neurobiology*, 70, 245-318.

Hamill, O.P., Marty, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch*. 391:85-100.

Hansen, A., y Finger, TE. (2000) "Phyletic distribution of crypt-type olfactory receptor neurons in fishes". *Brain, Behavior and Evolution*. Feb;55(2):100-10.

Hansen, A., y Finger, TE. (2008) "Is Trpm5 a reliable marker for chemosensory cells? Multiple types of microvillous cells in the main olfactory epithelium of mice". *BMC Neuroscience*. 9:115.

Hardie, R.C. (2007). "Vision: dynamic platforms". *Nature*, 450: 37–39.

Hardie RC, Minke B (1992). "The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors". *Neuron* 8:643-651.

Hofmann, T., Chubanov, V., Gudermann, T., and Montell, C. (2003). "TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel". *Current biology* : CB 13, 1153-1158.

Holy, T.E., Dulac, C., Meister, M. (2000). "Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli". *Science*, 289: 1569–1572.

Horowitz, L.F., Montmayeur, J.P., Echelard, Y., Buck, L.B. (1999). "A genetic approach to trace neural circuits". *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 96: 3194–3199.

Inamura, K., Kashiwayanagi, M. (2000). "Inward current responses to urinary substances in rat vomeronasal sensory neurons". *European Journal of Neuroscience* 12: 3529–3536.

Inamura, K., Kashiwayanagi, M., Kurihara, K. (1997). "Inositol-1,4,5-trisphosphate induces responses in receptor neurons in rat vomeronasal sensory slices". *Chemical Senses*, 22: 93–103.

Jakupovic, J., Kang, N., Baum, M.J. (2008). "Effect of bilateral accessory olfactory bulb lesions on volatile urinary odor discrimination and investigation as well as mating behavior in male mice". *Physiology and Behavior*, 93: 467–473.

Jia, C., Goldman, G., Halpern, M. (1997). "Development of vomeronasal receptor neuron subclasses and establishment of topographic projections to the accessory olfactory bulb". *Brain Research*, 102: 209–216.

Jia, C., Halpern, M. (1996). "Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins [Gi alpha 2 and G(o alpha)] and segregated projections to the accessory olfactory bulb". *Brain Research*, 719: 117–128.

Jones, D.T., y Reed, R.R. (1989). "G<sub>olf</sub>: an olfactory neuron specific G protein involved in odornt signal transduction". *Science*, 244:790-795.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., y Jessell, T.M. (2000). "Principles of neural science". pp 625-645. McGraw-Hill.

Kang, N., Baum, MJ., Cherry, JA. (2009) "A direct main olfactory bulb projection to the 'vomeronasal' amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males". *The European Journal of Neuroscience*. Feb;29(3):624-34.

Karlson, P., Luscher, M. (1959). "Pheromones": a new term for a class of biologically active substances". *Nature*, 183: 55–56.

Katz, S., Merzel, J. (1977). "Distribution of epithelia and glands of the nasal septum mucosa in the rat". *Acta Anatomica*. 99:58–66.

- Kelliher, K.R., Spehr, M., Li, X.H., Zufall, F., Leinders-Zufall, T. (2006). "Pheromonal recognition memory induced by TRPC2-independent vomeronasal sensing". *European Journal of Neuroscience*, 23: 3385–3390.
- Keverne, E.B.(2002). "Pheromones, vomeronasal function, and gender specific behavior". *Cell*, 108: 735–738.
- Keydar, I., Ben-Asher, E., Feldmesser, E., Nativ, N., Oshimoto, A., Restrepo, D., Matsunami, H., Chien, MS., Pinto, JM., Gilad, Y., Olender, T., Lancet, D. (2012). "General olfactory sensitivity database (GOSdb): Candidate genes and their genomic variations." *Human Mutation*. doi: 10.1002/humu.22212.
- Kleene, S.J., y Gesteland, R.C. (1991). "Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia". *Journal of Neuroscience*, 11, 3624-3629.
- Koyama S. (2004) "Primer effects by conspecific odors in house mice: a new perspective in the study of primer effects on reproductive activities". *Hormones and Behavior*. Sep;46(3):303-10.
- Krieger, J., Schmitt, A., Lobel, D., Gudermann, T., Schultz, G., Breer, H., Boekhoff, I. (1999). "Selective activation of G protein subtypes in the vomeronasal organ upon stimulation with urine-derived compounds". *Journal of Biological Chemistry*, 274: 4655–4662.
- Kroner, C., Breer, H., Singer, A.G., O'Connell, R.J. (1996). "Pheromone induced second messenger signaling in the hamster vomeronasal organ". *Neuroreport*, 7: 2989–2992.
- Kurahashi, T., y Yau, K.W. (1993). "Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells". *Nature* 363, 71-74.
- Leinders-Zufall, T., Rand, M.N., Shepherd, G.M., Greer, C.A., Zufall, F. (1997) "Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics". *Journal of Neuroscience*. Jun 1;17(11):4136-48.
- Leinders-Zufall, T., Greer, C.A., Shepherd, G.M., and Zufall, F. (1998). "Imaging odor induced calcium transients in single olfactory cilia: specificity of activation and role in transduction". *Jornal of Neuroscience* 18, 5630-5639.
- Leinders-Zufall, T., Lane, A.P., Puche, A.C., Ma, W., Novotny, M.V., Shipley, M.T., and Zufall, F. (2000). "Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons". *Nature*, 405, 792-796.

Leinders-Zufall, T., Brennan, P., Widmayer, P., PCS, Maul-Pavicic, A., Jager, M., Li, X.H., Breer, H., Zufall, F., Boehm, T. (2004). "MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ". *Science*, 306: 1033–1037.

Leypold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F., Axel, R. (2002) "Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice". *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 99: 6376–6381.

Liberles, SD., y Buck, LB. (2006). "A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium". *Nature*, 442(7103):645-50.

Lidow, M.S., Menco, B.P. (1984). "Observations on axonemes and membranes of olfactory and respiratory cilia in frogs and rats using tannic acid-supplemented fixation and photographic rotation". *Journal of Ultrastructural Research*. Jan;86(1):18-30.

Liman, E.R. (2003) "Regulation by voltage and adenine nucleotides of a  $Ca^{2+}$ -activated cation channel from hamster vomeronasal sensory neurons". *Journal of Physiology*, 548: 777–787.

Lin, W., Arellano J., Slotnick, B., Restrepo, D. (2004). "Odors detected by mice deficient in cyclic nucleotide-gated channel subunit A2 stimulate the main olfactory system". *Journal of Neuroscience*, 24, 3703-3710.

Lin, W., Margolskee, R., Donnert, G., Hell, S., Restrepo, D., (2007). "Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2471-2476.

Lin, W., Ezekwe, EA. Jr., Zhao, Z., Liman, ER., Restrepo, D. (2008) "TRPM5-expressing microvillous cells in the main olfactory epithelium". *BMC Neuroscience*, 9(1):114.

Liu, D., and Liman, E.R. (2003). "Intracellular  $Ca^{2+}$  and the phospholipid PIP2 regulate the taste transduction ion channel TRPM5". *Proceeding of the National Academy of Sciences* 100, 15160- 15165.

Liu, P., Shah, B.P., Croasdell, S., and Gilbertson, T.A. (2011). "Transient receptor potential channel type M5 is essential for fat taste". *Journal Neuroscience*, 31, 8634-8642.

Lledo, P.M., Gheusi, G., Vincent, J.D. (2005). "Information processing in the mammalian olfactory system". *Physiology Review*, 85:281-317.

Lowe, G., Gold, GH. (1993) "Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells". *Nature*, 366(6452)283-6.

- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., Zufall, F. (2003). "A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction". *Neuron*, 40: 551–561.
- Ma, W., Miao, Z., Milos V. (1998). "Role of the Adrenal Gland and Adrenal-Mediated Chemosignals in Suppression of Estrus in the House Mouse: The Lee-Boot Effect". *Biology of Reproduction* 59, 1317–1320.
- Ma, M. (2012). "Sensing in Nature". *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 739, 2012, pp 93-106.
- Madrid, R., Delgado, R., Bacigalupo, J. (2005). "Cyclic AMP cascade mediates the inhibitory odor response of isolated toad olfactory receptor neurons". *Journal of Neurophysiology*. Sep;94(3):1781-8. Epub 2005 Apr 7.
- Malnic, B, Hirono, J, Sato, T., Buck, LB. (1999). "Combinatorial receptor codes for odors". *Cell*. Mar 5;96(5):713-23.
- Mandiyan, VS., Coats, JK, Shah, NM. (2005). "Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice". *Nature in Neuroscience*, 8(12):1660-2.
- McCarthy, M.M., Auger, A.P. (2002). "He's a lover, not a fighter—smell, sex and civility". *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13: 183–18.
- McClintock, M.K. (1998). "On the nature of mammalian and human pheromones". *Annals of the New York Academy of Science*, 855: 390–392.
- Menco, B., (1997). "Ultrastructural Aspects of Olfactory Signaling". *Chemical Senses*, 295-311.
- Menco, B., Carr, V.M., Ezeh, P.I., Liman, E.R., Yankova, M.P. (2001). "Ultrastructural localization of G-proteins and the channel protein TRP2 to microvilli of rat vomeronasal receptor cells". *Journal of Comparative Neurology*, 438: 468–489.
- Meredith, M., Marques, D.M., O'Connell, R.O., Stern, F.L. (1980). "Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior". *Science*, 207: 1224–1226.
- Meredith, M., O'Connell, R.J. (1979). "Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ". *Journal Physiology*, 286: 301–316.
- Minke, B., Parnas, M. (2006). "Insights on TRP channels from in vivo studies in *Drosophila*". *Annual Review in Physiology*, 68: 649–684.

Mombaerts, P. (1999). "Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors". *Science*, 286:707-711.

Moombaerts, P. (2004). "Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors". *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 263-278.

Mombaerts, P. (2006). "Axonal wiring in the mouse olfactory system". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22:713-737.

Mori, K., Sakano, H. (2011) "How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain?". *Annual review of neuroscience*, 34:467-499.

Muller-Schwarze D. (1979). "Chemical Ecology: Odor Communication in Animals". New York: Elsevier.

Munger, SD., Leinders-Zufall, T., Zufall, F. (2009) "Subsystem organization of the mammalian sense of smell". *Annual Review of Physiology*. 71:115-40.

Murphy, F.A., Tucker, K., Fadool, D.A. (2001). "Sexual dimorphism and developmental expression of signal-transduction machinery in the vomeronasal organ". *Journal of Comparative Neurology*, 432: 61-74.

Nakamura, T., y Gold, GH. (1987). "A cyclic nucleotide-gated conductances in olfactory receptor cilia". *Nature*, 325(6103):442-4.

Nilius, B., Vennekens, R. (2006). "From cardiac cation channels to the molecular dissection of the transient receptor potential channel TRPM4". *European Journal of Physiology*, 453: 313-321.

Norlin, E.M., Gussing, F., Berghard, A. (2003) "Vomeronasal phenotype and behavioral alterations in G alpha i2 mutant mice". *Current Biology*, 13: 1214-1219.

Novotny, M., Jemiolo, B., Harvey, S., Wiesler, D., Marchlewska-Koj, A. (1986) "Adrenal mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice." *Science*. Feb 14;231(4739):722-5.

Ogura, T., Szebenyi, S.A., Krosnowski, K., Sathyanesan, A., Jackson, J., Lin, W. (2011) "Cholinergic microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium and effect of acetylcholine on olfactory sensory neurons and supporting cells". *Journal of Neurophysiology*, Sep;106(3):1274-87.

Palmer, R., Atwal, K., Bakaj, I., Carlucci-Derbyshire, S., Buber, M., Cerne, R., Corte's, R., Devantier, H., Jorgensen, V., Pawlyk, A., Lee, S., Sprous, D., Zhang, Z., Bryant, R., (2010). "Triphenylphosphine Oxide Is a Potent and Selective Inhibitor of the Transient

Receptor Potential Melastatin-5 Ion Channel". *ASSAY and Drug Development Technologies*. Vol. 8 No. 6, pp. 703-713.

Pedersen, S.F., Owsianik, G., Nilius, B. (2005). "TRP channels: an overview". *Cell calcium*, 38:233-252.

Pérez, CA., Huang, L., Rong, M., Kozak, A., Preuss, AK., Zhang, H., Max, M., Margolskee, RF. (2002). "A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells". *Nature in Neuroscience*, (5):1169-1176.

Pro-Sistiaga, P., Mohedano-Moriano, A., Ubeda-Bañon, I., Del Mar Arroyo-Jimenez M., Artacho-Pérula, E., Crespo, C., Insausti, R., Martinez-Marcos, A. (2007). "Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon". *The Journal of Comparative Neurology*. 1;504(4):346-62.

Rasche, S., Toetter, B., Adler, J., Tschapek, A., Doerner, J.F., Kurtenbach, S., Hatt, H., Meyer, H., Warscheid, B., y Neuhaus, E.M. (2010). "Tmem16b is specifically expressed in the cilia of olfactory sensory neurons". *Chemical Senses*, 35, 239-245.

Rawson, N.E., Eberwine, J., Dotson, R., Jackson, J., Ulrich, P., Restrepo, D. (2000). "Expression of mRNAs encoding for two different olfactory receptors in a subset of olfactory receptor neurons". *Journal of Neurochemistry*, 75:185-195.

Reisert, J., y Matthews, H. (1998). "Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> Extrusion Governs Response Recovery in Frog Olfactory Receptor Cells". *The Journal of General Physiology*, Vol. 112 529-535.

Restrepo, D., Zviman, M.M., Rawson, N.E. (1995). "Imaging of intracellular calcium in chemosensory receptor cells. In *Experimental Cell Biology of Taste and Olfaction*", A.I. Spielman, and J.G. Brand, eds. (Boca Raton: CRC Press, Inc.), pp. 387-398.

Restrepo, D., Arellano, J., Oliva, A.M., Schaefer, M.L., Lin, W. (2004). "Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice". *Hormones and Behavior*. 46, 247-256.[8] Choi EJ, Xia Z, Storm DR. (1992). "Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin". *Biochemistry*, 31(28):6492-8.

Ressler, K.J., Sullivan, S.L., Buck, L.B. (1994). "Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb". *Cell*, 79:1245-1255.

Rodriguez, I., Greer, C.A., Mok, M.Y. (2000). "A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa". *Nature Genetic*, 26:18-19.

Rodriguez, I., Mombaerts, P. (2002). "Novel human vomeronasal receptor-like genes reveal species-specific families". *Current Biology*; 12:R409-R411.

Rugh, R. (1990). "The Mouse, Its Reproduction and Development". Oxford: Oxford University Press; 38–39.

Runnenburger, K., Breer, H., Boekhoff, I. (2002). "Selective G protein beta gamma-subunit compositions mediate phospholipase C activation in the vomeronasal organ". *European Journal in Cell Biology*, 81: 539–547.

Ryba, N.J.P., y Tirindelli, R. (1997). "A new multigene family of putative pheromone receptors". *Neuron*, 19, 371–379.

Sanhueza, M., Schmachtenberg, O., and Bacigalupo, J. (2000). "Excitation, inhibition, and suppression by odors in isolated toad and rat olfactory receptor neurons". *American journal of physiology Cell Physiology*, 279, C31-39.

Schmachtenberg, O., Diaz, J., and Bacigalupo, J. (2003). "NO activates the olfactory cyclic nucleotide-gated conductance independent from cGMP in isolated rat olfactory receptor neurons". *Brain Research* 980, 146-150.

Shi, P., Zhang, J. (2007). "Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land". *Genome Research*, 17:166-174.

Spehr, M., Hatt, H., Wetzel, C.H. (2002). "Arachidonic acid plays a role in rat vomeronasal signal transduction". *Journal of Neuroscience*, 22: 8429–8437.

Spehr, M., Kelliher, KR., Li, XH., Boehm, T., Leinders-Zufall, T., Zufall, F. (2006). "Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands". *Journal of Neuroscience*. 15;26(7):1961-70.

Stephan, A.B., Shum, E.Y., Hirsh, S., Cygnar, K.D., Reisert, J., y Zhao, H. (2009). "ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification". *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 106, 11776-11781.

Stern, K., McClintock, M.K.(1998). "Regulation of ovulation by human pheromones". *Nature*. 12;392(6672):177-9.

Stohr, H., Heisig, J.B., Benz, P.M., Schoberl, S., Milenkovic, V.M., Strauss, O., Aartsen, W.M., Wijnholds, J., Weber, B.H., y Schulz, H.L. (2009). "TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals". *Journal of Neuroscience*, 29, 6809-6818.

- Sugai, T., Sugitani, M., Onoda, N. (1997). "Subdivisions of the guinea-pig accessory olfactory bulb revealed by the combined method with immunohistochemistry, electrophysiological, and optical recordings". *Neuroscience*, 79: 871–885.
- Talavera, K., Yasumatsus K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, RF., Nilius, B. (2005). "Heat Activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste". *Nature Letters*, (438):1022-1025.
- Tanaka, M., Treloar, H., Kalb, R.G., Greer, C.A., Strittmatter, S.M. (1999). "G(o) protein-dependent survival of primary accessory olfactory neuron". *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 96: 14106–14111.
- Thompson, J., Salcedo, E., Restrepo, D., Finger, T. (2012). "Second-order input to the medial amygdala from olfactory sensory neurons expressing the transduction channel TRPM5". *The Journal of comparative neurology*, 520(8):1819-30.
- Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S., y Menini, A. (2009). "From pheromones to behavior". *Physiology Review* 89, 921-956.
- Trotier, D. (2011). "Vomer nasal organ and human pheromones". *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128, 184-190.
- Van Der Lee, S., Boot, L.M. (1955). "Spontaneous pseudopregnancy in mice". *Acta Physiologica et Pharmacologica Neerlandica*. 4(3):442-4.
- Vassar, R., Chao, S.K., Sitcheran, R., Nunez, J.M., Vosshall, L.B., Axel, R. (1994). "Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb". *Cell*, 79:981-991.
- Venkatachalam, K., Montell, C. (2007). "TRP channels". *Annual Reviews in Biochemistry*, 76: 387–417.
- Wang, Z., Sindreu, C., Li, V., Nudelman, A, Chan G, Storm D. (2006). "Pheromone detection in male mice depends on signaling through the type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium". *The Journal of Neuroscience*, 26(28):7375–7379.
- Wang, Z., Nudelman, A., and Storm, D.R. (2007). "Are pheromones detected through the main olfactory epithelium?". *Molecular Neurobiology*, 35, 317-323.
- Wang, Z., Storm, D.R. (2011). "Maternal behavior is impaired in female mice lacking type 3 adenylyl cyclase.". *Neuropsychopharmacology*, Mar; 36(4):772-81.
- Wayman, G.A., Impey, S., Storm, D.R. (1995). "Ca<sup>2+</sup> inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo". *Journal of Biological Chemistry*, 270, 21480–21486.

Wekesa, K.S., Millers S., Napiers A. (2003) "Involvement of G(q/11) in signal transduction in the mammalian vomeronasal organ". *The Journal of Experimental Biology*. 206(Pt 5):827-32.

Weeraratne, S.D., Valentine, M., Cusick, M., Delay, R., Van Houten, J.L. (2006) "Plasma membrane calcium pumps in mouse olfactory sensory neurons". *Chemical Senses*. Oct;31(8):725-30.

Wilson, D.A., y Rennaker, R.L. (2010). "Cortical Activity Evoked by Odors". In *The Neurobiology of Olfaction*, A. Menini, ed. (Boca Raton (FL).

Wilson, R.I., Mainen, Z.F. (2006) "Early events in olfactory processing". *Annual Review in Neuroscience*, 29:163-201.

Wysocki, C.J., y Preti, G. (2004). "Facts, fallacies, fears, and frustrations with human pheromones". *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 281, 1201-1211.

Wu, L.J., Sweet, T.B., Clapham, D.E. (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family". *Pharmacological reviews*, 62:381-404.

Xu, W., Leung, S., Wright, J., Guggino, S.E. (1999). "Expression of Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channels in Airway Epithelial Cells" *The Journal of Membrane Biology*, Volume 171, Issue 2, pp 117-126

Yan, C., Zhao, A.Z., Bentley, J.K., Loughney, K., Ferguson, K., Beavo, J.K. (1995). "Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons". *Proceedings of the National Academy of Science*, 92, 9677-9681.

Yoon, H., Enquist, L.W., Dulac, C. (2005). "Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility". *Cell*, 2005; 123:669-682.

Young, J.M., Trask, B.J. (2007). "V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum". *Trends Genetic*, 23:212-215.

Zhang. J., Pacifico, R., Cawley, D., Feinstein, P., Bozza, T. (2013). "Ultrasensitive detection of amines by a trace amine-associated receptor". *Jornal of Neuroscience*. Feb 13;33(7):3228-39.

Zhang, P., Yang, C., Delay, R.J. (2008). "Urine stimulation activates BK channels in mouse vomeronasal neurons". *Journal of Neurophysiology*, 100: 1824- 1834.

Zhang, P., Yang, C., Delay, R., (2009) "Odors activate dual pathways, a TRPC2 and a AA-dependent pathway, in mouse vomeronasal neurons", *American Journal of Physiology Cell Physiology*. May; 298(5): C1253–C1264.

Zhang, X., y Firestein, S. (2002). "The olfactory receptor gene superfamily of the mouse". *Nature Neuroscience*, 5:124-133.

Zhang, X., y Firestein, S. (2009). " Genomics of Olfactory Receptors". *Chemosensory Systems in Mammals, Fishes, and Insects Results and Problems in Cell Differentiation* Vol. 47, 2009, pp 239-255.

Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S., Ryba, N.J. (2003) "Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways". *Cell*, 112(3):293-301.

Zozulya, S., Echeverri, F., Nguyen, T. (2001). "The human olfactory receptor repertoire". *Genome Biology*, 2.

Zufall, F., Leinders-Zufall, T. (2000). "The cellular and molecular basis of odor adaptation". *Chemical Senses*, 25:473-481.

Zufall, F., Leinders-Zufall, T. (2007). "Mammalian pheromone sensing". *Current Opinion in Neurobiology*. Aug;17(4):483-9.

Zufall, F. y Munger, S.D. (2001). "From odor and pheromone transduction to the organization of the sense of smell". *Trends in Neurosciences*, 24(4):191-193.

Zufall, F., Ukhanov, K., Lucas, P., Liman, E.R., Leinders-Zufall, T. (2005). "Neurobiology of TRPC2: from gene to behavior". *European journal of physiology* 451:61-67.